

---

# **ESPRESSIONE ETEROLOGA IN PIANTA DI PROTEINE DI INTERESSE BIOMEDICALE**

---

**Maria Minutolo**

Dottorato in Scienze Biotechologiche – XX ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II







---

# **ESPRESSIONE ETEROLOGA IN PIANTA DI PROTEINE DI INTERESSE BIOMEDICALE**

---

**Maria Minutolo**

Dottoranda:	Maria Minutolo
Relatore:	Prof. Edgardo Filippone
Coordinatore:	Prof. Giovanni Sannia





# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>pag. 1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>pag. 2</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 7</b>
1.1 Uso delle piante per la produzione di proteine di interesse farmaceutico	pag. 7
1.2 La Apolipoproteina A-I e l'amiloidosi	pag. 9
1.3 La lecitina colesterolo aciltrasferasi (LCAT)	pag. 11
1.4 Scopo della tesi	pag. 13
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 14</b>
2.1 Analisi in silico	pag. 14
2.2 Substrati di coltura	pag. 14
2.3 Piante di tabacco, di mais e microrganismi usati	pag. 15
2.4 Geni e vettori utilizzati	pag. 15
2.5 Costruzione vettori di espressione e trasformazione di <i>A. tumefaciens</i>	pag. 16
2.6 Trasformazione transeunte e stabile di tabacco mediante <i>A. tumefaciens</i>	pag. 17
2.7 Reazione di amplificazione degli acidi nucleici	pag. 17
2.8 Analisi RT-PCR	pag. 17
2.9 Estrazione delle protein solubili totali e quantificazione delle proteine totali estratte	pag. 18
2.10 Separazione elettroforetica delle proteine totali (SDS-PAGE) e analisi Western	pag. 18
2.11 Preparazione dei campioni per le analisi immunoistochimiche	pag. 19
2.12 Immunolocalizzazione	pag. 20
2.13 Valutazione del numero di copie del trasgene	pag. 20
2.14 Stima quantitativa delle proteine ricombinanti espresse in tabacco	pag. 20
2.15 Rilievo dei dati morfometrici	pag. 21
2.16 Analisi statistica dei dati sperimentali	pag. 21
<b>3. RISULTATI</b>	<b>pag. 22</b>
3.1 Analisi <i>in silico</i> :	pag. 22
3.2 Costruzione dei vettori binari e trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> :	pag. 23
3.2.1 Costruzione dei vettori binari	pag. 23
3.2.2 Trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pag. 24
3.3 Trasformazione di <i>Nicotiana tabacum</i>	pag. 24
3.4 Analisi molecolari delle piante putative trasgeniche:	pag. 25

3.4.1	Analisi di amplificazione del DNA gnomico	pag.	25
3.4.2	Analisi di trascrizione dei transgeni	pag.	25
3.4.3	Analisi di espressione dei transgeni	pag.	26
3.5	Valutazione di caratteri fenotipici	pag.	26
3.6	Valutazione del numero di copie del trasgene	pag.	26
3.7	Stima quantitativa delle proteine ricombinanti espresse in <i>N. tabacum</i>	pag.	27
3.8	Stima della quantità e della stabilità della ApoA-I ricombinante espressa nelle piante Ap-T <sub>1</sub>	pag.	27
3.9	Ottenimento di colture cellulari liquide da tessuto fogliare di piante esprimenti la ApoA-I	pag.	28
3.10	Purificazione della ApoA-I espressa in foglie di tabacco	pag.	28
3.11	Localizzazione cellulare della ApoA-I espressa in tabacco	pag.	28
3.11.1	Colorazione con il blu di toluidina	pag.	28
3.11.2	Localizzazione cellulare	pag.	28
3.12	Localizzazione cellulare del mutante ApoA-I (L174S) e fibrillogenesi in tessuto fogliare di tabacco	pag.	29
3.13	Localizzazione cellulare della LCAT espressa in tabacco	pag.	29
3.14	Espressione e localizzazione cellule della zeolina espressa in semi di mais	pag.	29
3.15	Espressione e localizzazione cellule delle zeine nei semi di mais transgenici per la zeolina	pag.	30
3.16	Espressione della <i>Corn Legumin 1</i> (CL-1), della <i>Corn Alfa Globulin</i> (CAG) e della <i>Binding Protein</i> (BiP) nei semi transgenici per la zeolina	pag.	30
<b>4.</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>pag.</b>	<b>31</b>
4.1	Espressione della ApoA-I umana in piante e colture cellulari di tabacco	pag.	35
4.2	Espressione del peptide ApoA-I/93 e del mutante naturale ApoA-I(L174S) in tabacco	pag.	38
4.3	Espressione dell'enzima umano LCAT in tabacco	pag.	39
4.4	Analisi fenotipica delle piante Ap, AM ed LC	pag.	41
4.5	Espressione della zeolina nei semi di mais	pag.	42
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>pag.</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>TABELLE E FIGURE</b>	<b>pag.</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag.</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>ALLEGATI</b>	<b>pag.</b>	<b>97</b>

## RIASSUNTO

Il presente lavoro ha riguardato l'espressione in tabacco del gene umano apoA-I, codificante l'apolipoproteina A-I (ApoA-I), del suo peptide amiloide ApoA-I/93, del suo mutante naturale ApoA-I(L174S) e del gene codificante per l'enzima lecitina colesterolo aciltrasferasi (LCAT). Infine sono stati eseguiti esperimenti volti alla caratterizzazione di semi di mais esprimenti la zeolina.

Durante lo svolgimento del progetto sono stati costruiti vettori binari contenenti le sequenze in esame usati poi per trasformare piante di *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Nel corso del progetto, sono state ottenute diverse linee transgeniche per ciascun costrutto, tra queste sono state selezionate 4 linee esprimenti quantità di ApoA-I ricombinante pari quasi allo 0,1% delle proteine totali solubili (TSP). La ApoA-I ricombinante è stabile, non presenta prodotti tronchi e si accumula nel citoplasma, nei vacuoli e nell'apoplasto, risultando quindi parzialmente secreta. Il peptide ApoA-I/93 non è stato rivelato in nessuna delle piante transgeniche, positive all'analisi RT-PCR, saggiate; ciò suggerisce una degradazione post-traduzionale, dovuta ad una instabilità del peptide. Nel corso del progetto sono state ottenute 12 linee transgeniche esprimenti il mutante apoA-I (L174S), tra queste l'analisi western ha evidenziato in alcune un frammento di 12 kDa forse associabile al peptide di 93 aminoacidi. Tale ipotesi non è stata ancora confermata visti i risultati non conclusivi ottenuti mediante le analisi immuno-istochimiche. Per quanto concerne il gene *lcat*, sono state prodotte 6 piante esprimenti l'enzima ricombinante in quantità pari a circa lo 0,05% del TSP. L'enzima espresso in pianta è stabile ma presenta un peso molecolare inferiore a quello dell'enzima espresso nel sistema omologo. La differenza, probabilmente da ascrivere ad un diverso pattern glicosidico, non dovrebbe alterare in modo significativo l'attività dell'enzima.

Presso il Dipartimento di Biotecnologie Molecolari dell'Università di Aachen, dove è stato svolto parte del lavoro di tesi, sono state seguite alcune ricerche del gruppo ospitante, relative alla caratterizzazione dell'espressione della zeolina nei semi di mais. La zeolina è una proteina chimerica ottenuta unendo i primi 98 aminoacidi N-terminali della gamma-zeina, proteina di accumulo del mais, e la faseolina di *Phaseolus vulgaris*. Tale lavoro era volto alla comprensione dell'impatto della zeolina, o meglio dei primi 98 aminoacidi della gamma-zeina, sul pattern d'espressione delle altre proteine wild type di mais. Infatti, si potrebbe unire tale frammento a qualsiasi proteina ricombinante ed indirizzarne l'accumulo nei corpi proteici dell'endosperma del mais. Il lavoro ha, quindi, riguardato l'espressione e la localizzazione cellulare delle zeine, della BiP (*Binding Protein*), della CL1 (*Corn Legumin 1*) e della CAG (*Corn Alfa Globulin*) nell'endosperma di semi esprimenti la zeolina. La zeolina non è presente ai margini dei corpi proteici (PBs) e tende ad accumularsi all'interno, apparentemente in associazione con l'alfa-zeina. Nell'endosperma dei semi transgenici i PBs presentano fenotipo alterato rispetto a quelli osservati nei semi *wild type*. Le analisi hanno evidenziato che la quantità di alfa-zeina espressa nei semi transgenici, non risulta alterata dalla presenza della zeolina, ma hanno mostrato alterazione nei livelli di espressione e nella distribuzione della beta- e della gamma-zeina. L'analisi western effettuata per verificare interferenze nell'espressione della CL1, della CAG e della BiP, ha mostrato che la zeolina sembra interferire anche con l'espressione di tali proteine.

## SUMMARY

Lipoproteins are classified in 5 classes on basis of lipid and proteins content. The most study are: *Low Density Lipoproteins* (LDL), known as “bad cholesterol”; and the *High Density Lipoproteins* (HDL), known as “good cholesterol”. The latter is involved in the “reverse cholesterol transport” (RTC) that maintains free cholesterol level constant to avoid its pathogenic accumulation in the arteries.

In the protein fraction of lipoproteins Apolipoprotein AI (Apo-AI) is the major HDL component (Dalton and Swaney, 1993) and it is involved in all the main RTC steps: (A) ApoA-I binds free cholesterol and the plasmatic nascent HDL; (B) ApoA-I activates the plasma enzyme lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) that converts free cholesterol into ester cholesterol (CE); and (C) at the end of RTC pathway, the HDL is delipidated in the liver where is the CE-selective uptake mediated by ApoA-I/SR-BI receptor interaction. The RTC pathway is important to maintain body cholesterol homeostasis and is currently the focus of intensive research.

The *apoA-I* gene encodes the 267 amino acids precursor, with the 18 amino acids signal pre-peptide, intracellularly cleaved, and 6 amino acids signal pro-peptide, cleaved in the plasma (Zannis *et al.*, 1983). Therefore, the ApoA-I is secreted into plasma as 249 amino-acid precursor and, after secretion, the pro-peptide is cleaved to yield the native 243 amino acid protein. As described above, LCAT also, like ApoA-I, plays an important role in the RCT pathway. LCAT is a soluble 416 amino acids enzyme that converts cholesterol into cholesterol esters (CE) on the HDL particles surface. The important rule of LCAT in the RCT is shown by Hoeg *et al* (1996a) study, in which human LCAT was over-expressed in cholesterol-fed rabbits. In these transgenic rabbits human LCAT over-expression increased HDL and ApoA-I levels so, transgenic rabbits were protect against diet induced atherosclerosis.

Towards ApoA-I plays a so important rule in the RCT its gene variants are involved in amyloidosis. So far, different mutations in the *apoA-I* gene have been related to various hereditary amyloidosis diseases (Benson, 1995; Tan and Pepys, 1994; Sakaki *et al.*, 1989; Booth *et al.*, 1997). The amyloidosis results by extracellular deposition of insoluble protein fibrils either locally or systemically (Dhodapkar *et al.*, 1999). Fibrils are non-branching and linear with 5 to 15 nm of diameter, and beta-sheets rich structure (Cascio *et al.*, 1989; Uversky and Fink, 2004; Bouchard *et al.*, 2000). Amyloid fibrils also show the typical green birefringence in polarized light after staining with Congo red dye, and fluorescence after thioflavine T reaction (Roterman *et al.*, 2001; Khurana *et al.*, 2001). Among the *apoA-I* gene variants amyloidosis related identified, one is the L174S (Obici *et al.*, 1999). When the primary structure is been screened, it shown that the polypeptide isolated from the fibrils had a 93 residues length.

So far, there aren't published studies on the plant expression of any human apolipoprotein. Human ApoA-I, is already cloned in different system like *E. coli* (Isacchi *et al.*, 1989; Moguilewsky, 1987), insect cells (Sorci-Thomas *et al.*, 1996) and hamster ovary cells (CHO, Malloty *et al.*, 1987). Compared to the animal and bacterial cells, plants are more secure, give higher quality product and very lower production cost. Indeed, plants are not affected by dangerous for human health pathogens. Protein translational system, unlike the micro organism, is very similar to the human system, because of correct post-translational modifications.

Human LCAT enzyme is been cloned in 3 different cell system: CHO, BHK and insect cells. Recombinant CHO-LCAT (Miller *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 1997; Chisholm *et al*, 1999) and BHK-LCAT (Hill *et al.*, 1993) are very similar to the human-LCAT,

except for the more complex and heterogenic glycosidic chains. LCAT expressed in insect cells is active but has lower carbohydrate amount (Miller *et al.*, 1996, Chawla and Owen 1995).

Regarding the amyloidogenic peptides, there are very few studies about their in plant expression. One of this is the human  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ 42) peptide cloned into *Solanum tuberosum* genome. This peptide, is related to Alzheimer disease and plants are used like bioreactor to produce vaccine (Hyung-Soon *et al.*, 2003; Shenk *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000). Very similar work is the expression of A $\beta$ (1–40) e (1–42) peptides in *Capsicum annum* var. *angulosum* (green pepper) to obtain antibody (Szabo *et al.*, 2004), or the human lactoferrin expressed into *S. tuberosum* (Nilsson and Dobson, 2003; Ando *et al.*, 2002; Nilsson and Dobson, 2003). All works regarding the expression of amyloidogenic ApoA-I/93 fragment, are been failure because of the strong fragment instability (Andreola *et al.*, 2003). ApoA-I/93 fragment is partially unfolded and easy degradable by the endogenous proteases.

One aim of my PhD project was to obtain suitable amount of human ApoA-I and LCAT protein in a heterologous system such as tobacco plants, in order to make functional, biochemical and at the end use their therapeutic property for the human health. Other aim of this study is to use tobacco plants as bioreactor for the production of amyloidogenic 93 amino acids peptide (ApoA-I/93) to obtain suitable amount of it. The recombinant peptide will be use to make biochemical and functional assay to understand its physiological activity in the amyloidosis development above described.

An *in silico* analysis was performed to detected any ApoA-I homolog protein in tobacco in the *viridiplante* data bank. The output shows that only 5 polypeptides have a similarity with the query and, in addition, with a low percentage of identity. Therefore, we can exclude *in planta* the presence of functional or structural ApoA-I homolog. *In silico* analysis also revealed that ApoA-I pre-signal should be recognized, contrary to the pro-signal. For this reason, has been decided to express in tobacco plants the sequence coding the ApoA-I without the pre-pro signal peptide, so the recombinant ApoA-I should be accumulated into cytoplasm.

Regarding LCAT aminoacidic sequence, several LCAT-like proteins have been identified in plant. Those polypeptides seem to have an activity similar to the human one, but recent studies suggested that plant-LCAT is involved in the lipid content maintenance to regulate membrane fluidity (Noiriel *et al.*, 2004). In addition, bioinformatic analysis showed that the LCAT pre-signal should be recognized and exported to the apoplast. Therefore, the human LCAT cDNA sequence was cloned into a plant expression vector. Furthermore, human LCAT is a glycoprotein and *in silico* analysis showed also that enzyme expressed in plant should have the correct post-translational modification.

All the cDNA and nucleotidic sequences, expressed in tobacco, are cloned under the control of 35S CaMV promoter (Topfer *et al.*, 1987). Six transgenic lines expressing recombinant ApoA-I with correct molecular weigh are obtained. Segregating analysis revealed plants in which are one or two transgene copies. Tobacco-ApoA-I amount in leaves is from 0,01 to 0,04% of total soluble proteins (TSP). Four T<sub>1</sub> plants obtained by auto-crossing from two different transgene single copy lines produce higher amount of recombinant than parental one. An approximatively quantification of protein was around 0,1 % of TSP.

Regarding to the localization of ApoA-I protein in tobacco transgenic leaf, analysis by fluorescent and electron microscope, after immuno staining by anti-apo polyclonal antibody, shown that recombinant ApoA-I is localized in the cytoplasm. However,

signal was detected also in vacuoles and apoplast, inferring a cellular secretion process.

Usually, secreted proteins require specific signal sequences to be exported (Dore *et al.*, 1989; Iturriaga *et al.*, 1989), but proteins can be secreted also through the secretory default pathway without peptide signal (Denecke *et al.*, 1990; De Loose *et al.*, 1991). Tobacco ApoA-I secretion is demonstrated also by immuno-blot analysis performed on total secreted proteins from tobacco cells culture obtained from tobacco transgenic lines expressing human ApoA-I. The secreted ApoA-I has higher molecular weight (74 kDa) than the purified human protein. This difference is probably due to the protein lipid-free state. Without lipids, ApoA-I auto-aggregates to stabilize itself (Abdul Ajees *et al.*, 2006).

About the genetic transformation of tobacco with an expression vector containing LCAT, 6 transgenic lines expressing recombinant enzyme are identified. The tobacco LCAT protein has a smaller molecular weight if compared to the human LCAT. One hypothesis to explain this difference is the different glycosylation pattern. The human LCAT is 65-68 kDa enzyme (Chung *et al.*, 1979; Doi and Nishida, 1981; Lima *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 2004) in which glycosylation is 20-25% of total weight (Jin *et al.*, 1997; Jonas, 1998; Lima *et al.*, 2004). Using different endoglycosidase is possible to convert human LCAT into 47 kDa fragment (Mc. Lean *et al.*, 1986). The tobacco LCAT 47-48 kDa apparent molecular weight, looks to be comparable at results reported in Mc Lean (Mc. Lean *et al.*, 1986). Therefore, tobacco recombinant LCAT could have no glycosylation. The exact biological function of LCAT oligosaccharidic chains is unknown. They can increase protein solubility (Hickmann *et al.*, 1997), could be important to obtain correct folding, to bind substrate and to regulate enzyme activity. So, the absence of one or more glycosidic chain could have dramatic impact on recombinant LCAT. Several studies have shown that LCAT glycosylation looks to be involved in the enzyme secretion and turnover but it isn't so much important for the enzyme activity. Kosman and Jonas (2001) mutagenized LCAT aminoacidic sequence to remove specific glycosidic chain and express them into CHO cells to understand biological function of each glycosidic chain. They demonstrated that removing the glycosidic chain on residue number 84 led to obtain recombinant LCAT with decreased enzymatic activity, while removing glycosidic chain on residue number 384 led to express recombinant LCAT with a double enzymatic activity than the human LCAT. So activity assays should be done to understand if the tobacco recombinant LCAT is active. Segregating analysis revealed plants in which are one or two transgene copies. Recombinant LCAT expressed in tobacco is stable and its expression level in leaf fresh tissue is around the 0.06% of TSP. As suggested by *in silico* analysis, LCAT with its signal peptide looks to be secreted. Leaf tissue checked at electron microscope, after immune-staining by anti-lcat polyclonal antibody, showed that recombinant enzyme is localized in vacuoles and partially in the apoplast, suggesting its secretion. This cannot be considered a definitive result because of partial unspecific binding property of used polyclonal antibody and then more studies need for confirming the hypothesis.

Regarding the amyloidogenic peptide, because of failure to produce it in any biological system, has been tested two different strategies: expression of fragment *apoA-I/93* coding the amyloidogenic peptide and expression of *apoA-I(L174S)* cDNA encoding the natural ApoA-I variant that led to 93 aminoacids peptide accumulation. Transgenic plants in which *apoA-I/93* transcript is present are identified, but western analysis did not show the recombinant peptide expression. This result is probably due to the strong fragment instability already seen in the other biological system used

to produce the recombinant peptide (Andreola *et al.*, 2003). Molecular analysis of plants expressing *apoA-I(L174)* variant, revealed a product with correct molecular weight (28kDa). Segregating analysis revealed plants in which are one or two transgene copies. Recombinant ApoA-I(L174) expressed in tobacco is stable and its expression level in leaf fresh tissue is around the 0.01-0.05% of TSP. It is also possible to see the presence of smaller fragment. This fragment has an apparent molecular weight of 12 kDa, very similar to the 11 kDa expected for amyloidogenic peptide, but no fibrils are observed in the leaf tissue, at the electron microscope. This could be due to polyphenols tobacco content (Li Z. *et al.*, 2003), that can inhibit fibrils development (Porat *et al.* 2006), probably due to the polyphenols antioxidant property. More analysis are necessary to understand if the 12kDa fragment observed in the transgenic plants is really the expected amyloidogenic peptide.

In the last year of PhD project maize seeds expressing zeolin protein have been characterized. Those experiments are developed in the Dr. Eva Stoger research group with Dr. Elsa Arcalis help (Molecular Biotechnology Department, Aachen University) who have collaboration with Prof. Alessandro Vitale (Plant Biology and Biotechnology Institute, CNR-Milano). Zeins and phaseolin are major storage endosperm protein in *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris* seeds. Zeolin is chimerical protein with first gamma-zein 89 aminoacids and phaseolin (Mainieri *et al.*, 2004). Aim of this work was to understand if is possible to use gamma-zein N-terminal fragment to hyper-accumulate any recombinant protein in the maize endosperm, making chimerical proteins. Zeolin is correctly expressed in maize endosperm, it cannot build own protein bodies because it is always found together with the other zeins. Some zeins expression is altered, gamma-zeins (16kDa and 27kDa) result to be decrease whereas the 15kDa beta-zein expression is increased. Also the non zein proteins result affected: globulins and BIP amount is increased. Finally, checking the ultrastructure, two phenotypes have been identified: higher number and amorphous protein bodies.

The altered protein bodies morphology and the altered zein expression levels are effects already seen in maize endosperm. In the last years many maize opaque endosperm mutants have been identified. Significant differences in non zein and zein proteins were found in most of them (Hunter. *et al.*, 2002). Opaque mutants, such as *floury2 (fl2)*, *Mucronate (Mc)*, and *Defective endosperm B30 (DeB30)*, are associated with irregularly shaped protein bodies (Fontes *et al.*, 1991; Coleman *et al.*, 1997b).

Zeolin expression could down regulate the 27kDa and 16kDa gamma-zeins because of its N-terminal aminoacidic sequence from the 27kDa gamma-zein. Beta-zein and the gamma-zein play an important role in the protein body development binding and organizing alfa- and delta-zeins. This could explain the beta-zein increased amount observed in the zeolin endosperm. The beta-zein amount could to increase in the attempt to compensate the gamma-zein reduction. Regarding the increase of BIP amount in zeolin endosperm, one hypothesis could be that it represents a normal cellular stress response to the presence of altered protein processing and assembly. This explanation is supported by different maize mutants known in which different mutations affecting different zeins subclasses result in the same BiP increased response (Salamini *et al.* 1985).

To conclude, at the end of PhD project, transgenic plants expressing stably human ApoA-I, LCAT enzyme and ApoA-I(L174S) amyloidogenic variant are obtained. This is the first work regarding their expression in plant and for the ApoA-I(L174S) amyloidogenic variant is the first work regarding its expression in any biological system. Recombinant tobacco ApoA-I is localized in the cytoplasm, vacuoles and in

the apoplast and the expression level obtained is around the 0,1% of TSP. It has been demonstrated that tobacco cells culture obtained from transgenic tobacco plants the recombinant ApoA-I is secreted into liquid substrate making more easy to purify it.

Recombinant tobacco LCAT has a lower molecular weight if compared to human enzyme, suggesting its hypo-glycosilation. The expression level obtained is variable between the 0.02 and the 0.06% of TSP and it seems to be secreted.

Recombinant tobacco ApoA-I (L174S) expression level is variable between the 0.01 and the 0.05% of TSP. In transgenic plants a 12 kDa fragment is been identified. This could be the attended amyloidogenic peptide but no fibrils are detected in the leave tissue so, more experiments are necessary to characterize it.

Regarding characterization of zeolin expression in maize seeds, transgenic plants produce very low amount of seeds. Zeolin is expressed in maize endosperm and is co-localized together with the zeins. Maize wild type zeins expression is affected and their distribution within the protein bodies is disturbed. Globulins and binding protein (BiP) expression is increased. Two phenotypes are been identified: higher number and amorphous protein bodies. It is not clear why zeolin is localized within the alfa-zeins and more investigation are necessary to understand this.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Uso delle piante per la produzione di proteine di interesse farmaceutico

Inizialmente l'uso delle piante, oppure delle cellule vegetali, per la produzione di polipeptidi ricombinanti è stato accolto con grande scetticismo (Fischer *et al.*, 2003; Schillberg *et al.*, 2003), ma negli ultimi anni le ricerche ne hanno ampiamente dimostrato l'enorme potenziale in campo farmaceutico, sia in campo umano che veterinario (Giddings *et al.*, 2000; Giddings, 2001) e chimico (Felsot, 2000; Hood *et al.*, 1999a e 1999b), offrendo un sistema semplice ed a basso costo alternativo al sistema batterico ed al sistema animale (Stoger *et al.*, 2002). E' stato stimato che i costi di produzione delle proteine ricombinanti in pianta possono essere 90 volte più bassi rispetto agli altri sistemi (Schillberg *et al.*, 2003) e che nel 2010, il valore degli "PMP" ("Plant Made Pharmaceuticals") raggiungerà i 50 miliardi di dollari (McGrath, 2002).

Le piante, paragonate con altri sistemi biologici quali i batteri, le cellule animali e di insetto, presentano numerosi vantaggi. Una caratteristica è l'assenza in pianta di patogeni umani (Giddings *et al.*, 2000): ciò permette la produzione di polipeptidi ricombinanti senza rischi per la salute umana. Ancora, un vantaggio importante, rispetto ai batteri, è la possibilità di avere le modifiche post-traduzionali e quindi una proteina correttamente maturata, strutturalmente e funzionalmente attiva. In alcuni casi le piante si sono dimostrate decisamente più efficienti dei sistemi animali (Larrick *et al.*, 2001). Ad oggi diverse proteine ricombinanti sono state prodotte in pianta, dimostrando l'abilità delle piante di competere con i sistemi di produzione industriali. Tra queste sono incluse proteine umane del plasma e del sangue, quali l'albumina (Goddijn e Pen 1995, Sijmons *et al.*, 1990), l'apoproteina (Zhong *et al.*, 1999), l'encefalina (Takamatsu *et al.*, 1990; Vandekerckhove *et al.*, 1989), l'emoglobina (Dieryck *et al.*, 1995; Halling-Sorensen *et al.*, 1998), antigeni quali vaccini per uso umano o veterinario (Richter *et al.*, 2000), fattori di crescita, ormoni, citochine (Giddings *et al.*, 2000), enzimi di interesse terapeutico, la angiotensina 1 (Hamamoto *et al.*, 1993), la proteina C (Cramer *et al.*, 1996), la glicocerebrosidasi (Cramer *et al.*, 1996; Steiner, 2000) e per finire gli anticorpi (Fischer *et al.*, 2003; Gomord e Faye, 2004; Hiatt *et al.*, 1989; Ma *et al.*, 1995; Stoger *et al.*, 2000).

Negli anni sono stati sviluppati diverse tecniche per il trasferimento dei geni di interesse nelle cellule vegetali. I più usati si basano su metodi indiretti, con l'uso del batterio *Agrobacterium tumefaciens*, oppure diretti, come la biolistica con l'uso del cannone genetico. La scelta del metodo migliore per ottenere le piante transgeniche dipende dalla pianta usata. Entrambi i metodi sono usati con successo per la produzione di anticorpi (Giddings, 2001). L'*A. tumefaciens* è stato ottimizzato per la trasformazione delle dicotiledoni come il tabacco, mentre il secondo è spesso preferito perché impiegabile non solo per le specie normalmente utilizzate in laboratorio ma anche per quelle non usuali (Christou, 1993). Ad esempio, questa tecnica ha permesso l'inserimento del gene di interesse nell'alga verde *C. reinhardtii* (Mayfield *et al.*, 2003), permettendo l'ottenimento di un anticorpo ricombinante in quantità pari allo 0,5-1% delle proteine totali solubili (Franklin e Mayfield, 2004). La resa può rappresentare un fattore limitante per la produzione di proteine di interesse in pianta, ma negli ultimi anni i vettori per l'espressione sono stati ottimizzati, recanti

promotori più efficienti, sequenze 5'-UTR per la stabilizzazione della traduzione, sequenze segnale per l'invio e/o la ritenzione delle proteine in compartimenti subcellulari particolari (Schardl *et al.*, 1987; Sleat *et al.*, 1987; Mitsuhashi *et al.*, 1996; De Wilde *et al.*, 2000; Hellens *et al.*, 2000). La scelta del promotore è fondamentale. Gli anticorpi, ad esempio, possono essere espressi nei semi (Stoger *et al.*, 2000; Saalbach *et al.*, 2001; De Jaeger *et al.*, 2002) oppure, nel caso della patata, nei tuberi (Artsaenko *et al.*, 1995). L'espressione in tessuti quali i semi permette di conservare grandi quantità di tessuto senza pericolo di esporre le proteine ricombinanti all'azione delle proteasi. Ad esempio, gli anticorpi possono essere espressi nei semi di riso e rimanere stabili per anni senza perdita significativa di attività (Conrad e Fiedler, 1998, Stoger *et al.*, 2000). Ad oggi, il miglior risultato è stato ottenuto usando il promotore seme specifico *arc 5-1* da *Phaseolus vulgaris*, per esprimere un scFv in *A. thaliana* (De Jaeger *et al.*, 2002). Tale promotore ha permesso di produrre la proteina ricombinante in quantità pari al 53% delle proteine totali, ma già con quantità pari allo 0,1-1% rende il sistema pianta estremamente competitivo (Hood *et al.*, 2002). Una strategia recente è stata l'uso di un promotore radice-specifico per la secrezione della proteina ricombinante di interesse dalle radici di piante allevate in coltura idroponica (Drake *et al.*, 2003). Anche i promotori inducibili possono essere un'alternativa interessante poiché permettono di regolare l'espressione del transgene nel tempo, quando attivati da sostanze chimiche (Padidam, 2003) oppure da stress meccanico (Cramer *et al.*, 1999). L'espressione può essere ulteriormente incrementata scegliendo l'opportuno compartimento cellulare in cui indirizzare la proteina ricombinante. La compartimentazione influisce enormemente sulla resa a causa della diversa stabilità, della capacità di acquisire il corretto *folding* e per la diversa esposizione alle proteasi endogene (Schillberg *et al.*, 2002, Giddings *et al.*, 2000; Conrad e Fiedler, 1998). Ancora, la compartimentazione influisce sulla struttura delle catene glicosidiche, perché gli enzimi coinvolti sono essi stessi compartimentati, e ciò può facilitare l'isolamento e la purificazione della proteina trasgenica. Questa si può accumulare anche nel citoplasma, ma Schillberg *et al.* (2002) hanno dimostrato che è possibile accumulare maggiori quantità di scFvs quando questi sono compartimentati. Le glicoproteine N-glicosilate, possono essere indirizzate al reticolo endoplasmatico (ER) attraverso un peptide segnale. Spesso anche segnali i peptidi dell'organismo omologo possono essere correttamente riconosciuti e funzionare perfettamente anche in pianta (Ma *et al.*, 2005). La presenza delle proteine "chaperone" nel ER, come la BiP, gioca un ruolo importante sull'acquisizione del corretto *folding* e quindi sulla stabilità della proteina eterologa (Nuttall *et al.*, 2002), influenzandone la resa. La quantità di proteina ricombinante può essere ulteriormente incrementata indirizzandola al lume dell'ER con un segnale H/KDEL C-terminale. Con tale segnale, è stato osservato un incremento dell'espressione delle proteine ricombinanti di 2-10 volte (Schillberg *et al.*, 2002). Il segnale KDEL blocca la proteina nel ER per cui le proteine presentano glicani con residui di GlcNAc, di beta (1,2)-xilosio e alfa (1,3)-fucosio (Sriraman *et al.*, 2004). Le proteine indirizzate al vacuolo, invece, mancano del residuo GlcNAc ma presentano ancora il *core* di xilosio e fucosio (Cabanes-Macheteau *et al.*, 1999). Tali residui, xilosio e fucosio, non sono presenti nell'uomo e potrebbero quindi determinare reazioni immunogeniche (Bardor *et al.*, 2003). Recenti studi hanno dimostrato che tali residui sono riconosciuti, occasionalmente, dalle IgE dei pazienti allergici ai pollini o ai cibi vegetali (Van Ree *et al.*, 2000; Foetisch *et al.*, 2003). In realtà anche le cellule CHO producono proteine ricombinanti con residui alfa(1,3)-galattosio che potrebbero far insorgere, nell'uomo, una risposta immunogenica.

Attualmente lo sviluppo di tecnologie per usi alternativi delle piante assume importanza strategica per il tabacco: la sua diffusione, dovuta alla possibilità di applicare “facilmente” tecniche agronomiche e biotecnologiche, la possibilità di ottenere una notevole biomassa, lo rendono interessante per scopi alternativi quali la produzione di “PMP” (McGrath P., 2002), senza considerare l’enorme vantaggio di avere una pianta non alimentare che impedisce contaminazioni della catena alimentare umana e/o animale (Schillberg *et al.*, 2002; Schillberg *et al.*, 2003). Anche l’utilizzo delle colture cellulari vegetali, oppure colture di organi, sono ampiamente usate per la produzione di anticorpi (Doran, 2000; Fischer *et al.*, 1999a; Sharp e Doran, 2001a e 2001b; Torres *et al.* 1999). Le colture cellulari hanno bisogno di accorgimenti maggiori rispetto alle piante, ciò non toglie che i costi necessari per la produzione di proteine ricombinanti sono comunque inferiori a quelli delle cellule di mammifero visto che richiedono mezzi di coltura estremamente semplici. Le proteine ricombinanti espresse nelle colture cellulari possono essere indirizzate all’apoplasto e successivamente diffondere nel mezzo liquido. Una parte di queste sarà trattenuta dalla matrice della parete cellulare ma può essere facilmente rilasciata nel mezzo liquido mediante una leggera digestione con pectinasi. Questa strategia preserva le cellule dalla rottura ed impedisce di liberare nel mezzo liquido proteasi, fenoli e altri contaminanti endogeni (Doran, 2000; Fischer *et al.*, 1999a). Negli ultimi anni, un sistema alternativo per la produzione di peptidi di interesse farmaceutico, con elevato potenziale in termini di resa è rappresentato dalle alghe unicellulari. Un esempio è l’alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Franklin e Mayfield, 2004) per la quale si è già dimostrato la possibilità di produrre anticorpi mediante trasformazione plastidiale (Mayfield *et al.*, 2003). Paragonato alla crescita cellulare delle piante, *C. reinhardtii* cresce molto rapidamente: il numero di cellule in soluzione raddoppia in circa 8 ore. Pertanto, il tempo necessario per la produzione delle proteine ricombinanti è significativamente ridotto e valutato in 6 settimane per valutare l’espressione ed altre 6 per lo *scale up* (Mayfield e Franklin, 2005).

## 1.2 La Apolipoproteina A-I e l’amiloidosi

Le lipoproteine sono particelle con dimensioni variabili da 10 a 1000 nm, costituite da un nucleo idrofobico contenente esteri di colesterolo, trigliceridi, acidi grassi e vitamine lipo-solubili ed un guscio idrofilico, composto da varie apolipoproteine, fosfolipidi e colesterolo. Esistono 5 classi lipoproteiche diverse (tabella 1.1) ed i termini “colesterolo cattivo” e “colesterolo buono” sono riferiti rispettivamente alle *Low Density Lipoproteins* (LDL) e alle *High Density Lipoproteins* (HDL) che differiscono nel contenuto proteico e lipidico. Le LDL possono depositare il colesterolo lungo le pareti arteriose, determinando un graduale restringimento del vaso e ostacolando la circolazione sanguigna. Le HDL presentano molteplici funzioni quali il prelievo di lipidi legati ad altre lipoproteine, il prelievo del colesterolo dalle membrane cellulari, la conversione del colesterolo in esteri di colesterolo mediante l’enzima LCAT ed il trasferimento degli esteri di colesterolo al fegato. Quest’ultimo meccanismo è detto trasporto inverso del colesterolo (*Reverse Cholesterol Transport*, RCT) e permette il trasferimento del colesterolo libero in eccesso alle cellule epatiche, dove viene catabolizzato, impedendone l’accumulo lungo i vasi sanguigni e la formazione delle placche aterosclerotiche. Il metabolismo delle lipoproteine plasmatiche è regolato dalle loro specifiche apoproteine, note appunto come apolipoproteine. Le apolipoproteine sono capaci di legare i lipidi, sono di fatto delle *Lipid binding protein* (Havel *et al.*, 1980) e sono implicate in diversi meccanismi

quali la stabilizzazione degli stessi complessi lipoproteici (Banka, 1995; Sorci *et al.*, 1995) e l'attivazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico (Jonas *et al.*, 1984; Steinmetz *et al.*, 1983).

E' nota da tempo l'esistenza di una relazione inversa tra i livelli plasmatici delle HDL e l'insorgenza di patologie coronariche (figura 1.1) Tale relazione inversa è attribuita al ruolo stesso delle HDL nel RCT e, in particolare, all'apolipoproteina A-I (ApoA-I). L'efficienza del RCT, quindi l'efficienza delle stesse particelle HDL, dipende dalla capacità della ApoA-I di promuovere il flusso di colesterolo cellulare, legare i lipidi, attivare la lecitina colesterolo aciltrasferasi (LCAT), e formare il complesso HDL. L'ApoA-I è coinvolta in tutti le tre fasi del RCT (figura 1.2): (a) trasferimento del colesterolo libero (CL) ad un accettore mediante l'*ATP-binding cassette transporter* A1 (ABCA1), che trasferisce il colesterolo e i fosfolipidi dalla superficie interna della membrana plasmatica verso l'esterno); (b) esterificazione del CL e formazione degli esteri di colesterolo (EC) mediante la reazione catalizzata dalla LCAT; (c) interazione con il recettore *scavenger receptor* (SR-BI), posto sulla membrana delle cellule epatiche, tramite il quale la HDL si libera degli esteri di colesterolo (figura 1.3).

L'ApoA-I (figura 1.4) rappresenta il 70% della componente proteica del complesso HDL (Dalton e Swaney, 1993). La proteina, sintetizzata nelle cellule epatiche e da quelle dell'epitelio intestinale, viene rilasciata nella sua forma matura sottoforma di un singolo polipeptide di 243 aminoacidi, con un acido glutammico come residuo C-terminale ed un acido aspartico come residuo N-terminale, e presenta un peso molecolare pari a 28.100 Dalton. Il gene codifica per un precursore, la pre-pro-apolipoproteina, che comprende un segnale pre-peptidico di 18 aminoacidi, proteolizzato co-traduzionalmente e un pro-peptide di 6 aminoacidi (Zannis *et al.*, 1983). L'ApoA-I, dunque, viene secreta nel plasma sottoforma di pro-apolipoproteina di 249 amminoacidi e, solo successivamente, viene proteolizzata nella sua forma matura da una proteasi plasmatica, non ancora identificata.

Sebbene l'ApoA-I giochi un ruolo tanto importante nel mantenimento dei livelli di colesterolo libero nel sangue, numerosi alleli mutanti sono coinvolti nell'insorgenza dell'amiloidosi. Il termine amiloidosi è utilizzato per descrivere un eterogeneo gruppo di malattie caratterizzate dalla deposizione in sede extracellulare di materiale proteico fibrillare (Dhodapkar *et al.*, 1999) a seguito di modifiche conformazionali della proteina precursore, seguite da auto-aggregazione entro o fuori la cellula. Queste molecole auto-organizzate successivamente si depositano (nell'ambito delle patologie neurodegenerative, i depositi sono spesso chiamati placche) e determinano l'insorgenza di patologie quali l'Alzheimer, il Parkinson, l'Huntington, le patologie prioniche, le amiloidosi, ed il diabete di tipo II (Agorogiannis *et al.*, 2004; Cohen, 1999 e 2003; Dobson, 1999 e 2003; Gregersen *et al.*, 2003; Muchowski, 2002; Ross e Poirier, 2004; Sadana e Vo-Dinh, 2001; Soto, 2001 e 2003; Thompson e Barrow, 2002; Uversky, 2003). Esistono diverse proteine e polipeptidi associati all'amiloidosi (attualmente se ne conoscono più di 20), le cui sequenze aminoacidiche, allineate, non presentano omologia. Nonostante ciò, tutte formano fibrille con ultrastruttura e proprietà chimico-fisiche simili.

Le fibrille hanno una morfologia allungata con un diametro di circa 5–15 nm (figura 1.5) e una struttura ricca di foglietti beta (Cascio *et al.*, 1989; Uversky e Fink, 2004; Bouchard *et al.*, 2000). Un'altra caratteristica delle fibrille amiloidi è la capacità di interagire con sostanze specifiche quali il colorante Rosso Congo che genera la caratteristica birifrangenza verde brillante quando osservato al microscopio a luce polarizzata, e la tioflavina T che conferisce fluorescenza (Roterman *et al.*, 2001; Khurana *et al.*, 2001). Il termine amiloide fu coniato nel 1854, quando Rudolph Virchow osservando tessuti amiloidi notò risposta positiva alla reazione iodio-

sulfurica che suggeriva la presenza di glucidi analogamente a quanto possibile osservare con l'amido. Le analisi chimiche successive dimostrarono che la componente principale è di natura proteica e che una componente polisaccaridica è presente sotto forma di glicosaminoglicani (Sipe, 1992) e glicoproteine di cui la più rilevante, per quantità e funzione, è la "Serum Amyloid P Component" (Pepys *et al.*, 1997). La classificazione delle amiloidosi viene fatta considerando la natura della proteina principale che costituisce la fibrilla e il tipo di organi interessati, poiché ciò può generare quadri clinici tra loro estremamente diversi (Westermarck, 1999). L'obiettivo primario del trattamento dell'amiloidosi sistemica è costituita dall'inibizione della sintesi del precursore proteico amiloidogenico (Merlini, 1995). Alcune amiloidosi hanno modalità di trasmissione autosomica dominante e l'esordio avviene in età adulta, per cui la consulenza genetica nelle famiglie affette è di fondamentale importanza dal punto di vista diagnostico e terapeutico.

Analisi di sequenza dei frammenti di DNA e lo studio dei polimorfismi di restrizione hanno consentito di caratterizzare numerose famiglie affette da amiloidosi ereditarie causate dalla ApoA-I. Quest'ultima rientra tra le proteine più studiate coinvolte nella genesi delle amiloidosi ereditarie: ne sono state studiate diverse varianti, ognuna delle quali rappresenta il precursore fibrillare nelle forme ereditarie delle particolari amiloidosi sistemiche (Benson, 1995; Tan e Pepys, 1994; Sakaki *et al.*, 1989; Booth *et al.*, 1997). E' la transizione di proteine e peptidi dallo stato globulare fisiologico a quello fibrillare patologico che porta alla formazione di fibrille amiloidi (figura 1.6), processo comune anche per i precursori mutanti di ApoA-I, responsabili di tali amiloidosi.

Nella tabella 1.2 sono elencate alcune varianti naturali del gene apoA-I, identificate, che provocano il rilascio del polipeptide amiloidogenico N-terminale.

Le mutazioni sono spesso puntiformi e determinano la sostituzione di un singolo amminoacido; tuttavia sono state identificate anche alcune delezioni/inserzioni. Le mutazioni identificate possono trovarsi sia all'estremità N-terminale, sia nella regione centrale o al C-terminale della proteina *apoA-I*.

### 1.3 La lecitina colesterolo aciltrasferasi (LCAT)

Tre enzimi rivestono un ruolo importante nel trasporto lipoproteina-lipide: la lipasi lipoproteica, la lipasi epatica e la lecitina colesterolo aciltrasferasi (LCAT, E.C. 2.3.1.43). La lipasi lipoproteica viene sintetizzata in diversi tessuti, ma la maggior parte è presente nel tessuto adiposo e nel muscolo striato. E' richiesta per l'efficiente idrolisi dei trigliceridi nei chilomicroni e, soprattutto, nelle particelle VLDL. La lipasi epatica è simile alla lipasi lipoproteica perché agisce sulle superfici cellulari, legata ai proteoglicani eparan-solfati. E' sintetizzata negli epatociti. Partecipa alla lipolisi delle VLDL a IDL durante gli stadi finali della formazione delle LDL, nella idrolisi dei fosfolipidi e dei trigliceridi in HDL, e nella rimozione dei chilomicroni parzialmente degradati da parte del fegato. La LCAT è responsabile della sintesi della maggior parte degli esteri del colesterolo presenti nelle lipoproteine plasmatiche. E' sintetizzata negli epatociti e secreta nel sangue, dove agisce sulle HDL. Tra gli enzimi associati ai complessi lipoproteici, la LCAT ha un ruolo di primo piano nel trasporto inverso del colesterolo. Come riportato già discusso in precedenza, questo processo avviene nelle cellule dei tessuti extraepatici che rilasciano colesterolo cellulare e fosfolipidi dai domini ricchi di colesterolo. Tali lipidi sono catturati sulla superficie cellulare delle HDL pre-beta che è il substrato preferito della LCAT (figura 1.7). L'esterificazione del colesterolo attraverso la LCAT genera un gradiente che

permette al colesterolo cellulare di essere trasferito nel sangue. All'interno del fegato, gli esteriferi del colesterolo vengono idrolizzati a formare nuovamente colesterolo, che può essere secreto nella bile tal quale o dopo conversione in acidi biliari (Scriber *et al.*, 2001).

La LCAT è una glicoproteina di 416 aminoacidi sintetizzata dalle cellule epatiche e secreta nel plasma, dove circola associata alle HDL e, in misura minore, alle LDL. La LCAT è secreta sotto forma di pre-peptide che comprende una sequenza *leader* di 24 aminoacidi responsabile dell'esportazione dell'enzima al plasma.

L'enzima è di fatto un'aciltrasferasi che rimuove una catena acilica dalla posizione sn-2 della lecitina, trasferendola all'ossidrilico in posizione 3 del colesterolo, portando alla formazione di esteriferi di colesterolo (fig. 1.8).

Il mancato funzionamento della LCAT, determina l'insorgenza di patologie caratterizzate da riduzione dei livelli plasmatici di HDL (ipo-alfalipoproteinemia). Tali patologie sono associate a mutazioni del gene *lcat* che causano due forme rare di dislipoproteinemia familiare, definite *Familial LCAT Deficiency* (FLD) e *Fish Eye Disease* (FED). Il primo caso di FLD, fu descritto nel 1967 (Norum e Gjone, 1967; Kuivenhoven *et al.*, 1997). Nei soggetti omozigoti, la LCAT perde completamente la capacità di esterificare il colesterolo nel plasma, pertanto la quasi totalità del colesterolo plasmatico è in forma insolubile. Dal punto di vista clinico, l'accumulo di lipidi in diversi tessuti porta all'insorgenza di: opacità corneale (causata da lesioni corneali che si sviluppano nell'infanzia); papilledema (scarso rifornimento sanguigno che porta ad una perdita graduale della vista); anemia; xantelasma (placca di forma ovale e di colorito giallastro che si forma sulle palpebre per deposito di lipidi nella cute); glomerulosclerosi focale (che può portare insufficienza renale e rendere necessaria l'emodialisi ed eventualmente il trapianto di rene).

Il primo caso di FED, invece, fu studiato nel 1979 (Kuivenhoven *et al.*, 1997). Nei soggetti omozigoti, la LCAT perde la capacità di esterificare il colesterolo HDL, ma mantiene la propria attività sul colesterolo LDL; lasciando circa il 50% del colesterolo plasmatico in forma non esterificata.

La principale manifestazione clinica è l'opacità corneale che si presenta del tutto simile, ma con un grado di opacizzazione corneale più alto, a quella osservata nelle persone affette da FLD, portando ad un indebolimento progressivo della vista in giovane età.

Nonostante l'ipoalfalipoproteinemia, i soggetti affetti da FLD e FED non sembrano esposti a un rischio cardiovascolare particolarmente elevato. Entrambe le patologie, come già accennato, sono di tipo familiare autosomica recessiva. Negli anni sono state identificate una serie di polimorfismi patogenici del gene, quali sostituzioni nucleotidiche, inserzioni o delezioni di base con conseguente *frameshift* del codice genetico (tabella 1.3).

Visto il ruolo fondamentale della LCAT nel RCT, è chiaro che l'enzima previene, in associazione con la ApoA-I, lo sviluppo delle patologie coronariche. E' noto infatti che la sua sovra-espressione nei conigli transgenici, previene lo sviluppo dell'aterosclerosi (figura 1.9). Hoeg *et al* (1996) osservarono infatti che conigli transgenici (Tg) esprimenti la LCAT umana presentavano un'attività LCAT 15 volte maggiore rispetto ad animali controllo (non-Tg) e che la sovra-espressione era associata ad un incremento pari a 6,7 volte della concentrazione della HDL (HDL-C). In esperimenti successivi, aumentando la somministrazione del colesterolo alimentare, si osservava un aumento dei livelli HDL. Ciò dimostrò che i conigli LCAT-Tg erano protetti dall'aterosclerosi indotta dall'alimentazione scorretta. Inoltre fu riscontrata una riduzione dell'86% delle placche aterosclerotiche pre-esistenti

suggerendo la LCAT come possibile nuovo target per la terapia di prevenzione dell'aterosclerosi.

## 1.4 Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi ha avuto come scopo l'applicazione di sistemi biotecnologici per la produzione in pianta della ApoA-I, del peptide amiloidogenico ApoA-I/93, del mutante naturale ApoA-I (L174S) e dell'enzima LCAT. L'intento è stato quello di ottenerne sufficienti quantità da mettere a disposizione di gruppi di ricerca interessati a studi di tipo diagnostico e di caratterizzazione biochimica e funzionale per comprenderne ruoli e funzioni nello sviluppo delle patologie prima esposte. Tale produzione potrebbe essere utile per indagare su applicazioni del potenziale amiloidogenico dell'*apoA-I(L174S)*, prodotto in larga scala, per la produzione di materiale nanofibrillare.

Il lavoro è stato realizzato nell'ambito di un progetto PRIN, in collaborazione con la Prof.ssa Renata Piccoli e la Dr.ssa Angela Arciello (Facoltà di Scienze Biotecnologiche, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II), che hanno reso disponibile le sequenze geniche della ApoA-I *wild type* e della variante naturale L174S e si sono occupate della purificazione della ApoA-I ricombinante mediante cromatografia di immunoaffinità.

L'espressione della LCAT in pianta, invece, si colloca nell'ambito di un progetto Telethon finalizzato alla ricerca del miglior ospite eterologo per produrre LCAT umana ed è stato realizzato in collaborazione con il Professor Guido Franceschini del Dipartimento di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano che ha reso disponibile la sequenza genica della Lcat.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Analisi *in silico*

Le analisi *in silico* sono state condotte attraverso l'ausilio di programmi bioinformatici disponibili in rete:

- "Blast" disponibile all'indirizzo <http://www.expasy.ch/tools/blast/>, per le analisi di omologia e identità di sequenza sfruttando la banca dati "*Viridiplantae*";
- "Graphical Codon Usage Analyser" disponibile all'indirizzo <http://gcu.schoedl.de/>, per le analisi di *codon usage* tra *Homo Sapiens* e *Nicotiana tabacum* nella trascrizione del gene d'interesse;
- "PSort" disponibile all'indirizzo <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>, per la predizione della localizzazione subcellulare della proteina d'interesse e per il riconoscimento delle sequenze segnale di glicosilazione.

### 2.2 Substrati di coltura

Per la preparazione di tutti i substrati è stata utilizzata acqua demineralizzata con deionizzatore Millipore ad osmosi inversa fino alla conducibilità elettrica di  $18,2 \text{ Mohm} \times \text{cm}^{-1}$ . La reazione finale dei vari substrati è stata portata a pH 5,8 con l'aggiunta di HCl 0,1N o KOH 0,1N. La sterilizzazione è stata condotta in autoclave ad una temperatura di  $120^\circ\text{C}$  ed alla pressione di 0,12 Mpa per 20 minuti. Tutte le operazioni in sterilità sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare orizzontale.

Gli ormoni vegetali sono stati aggiunti ai substrati prima della sterilizzazione, mentre gli antibiotici, previamente sterilizzati per filtrazione, sono stati aggiunti ai mezzi di coltura autoclavati quando questi hanno raggiunto la temperatura di  $40^\circ\text{C}$  circa. I substrati sono poi stati dispensati in capsule Petri di 10 cm di diametro (20 ml per capsula) per la coltura dei batteri su substrato solido e per la trasformazione genetica e selezione degli espianti trasformati. Per la micropropagazione delle piantine sono stati utilizzati vasi di coltura in vetro Pyrex da 500 ml (50 ml per vaso) o contenitori in plastica da 150 ml (25 ml per contenitore). I substrati utilizzati sono stati, per i batteri:

- 1 LB (*Luria Bertani Broth*, Miller, 1972) addizionato con gli antibiotici necessari, liquido o solido (agar, Oxoid  $15 \text{ g l}^{-1}$ ).
- 2 Per i tessuti vegetali e le piante:
- 3 MS, basato sulla formulazione di Murashige e Skoog (1962), con aggiunta di saccarosio  $30 \text{ g l}^{-1}$  e Microagar (Duchefa)  $8 \text{ g l}^{-1}$  quale gelificante
- 4 RTE, basato sulla formulazione di Murashige e Skoog (1962) addizionato con gli ormoni benzil-amminopurina (BAP,  $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) e l'acido indolacetico (IAA,  $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Tutte le operazioni in sterilità sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare orizzontale il cui interno è stato reso sterile prima dell'uso per azione di una lampada germicida a raggi UV tenuta accesa per almeno 20 minuti ed il cui piano di lavoro era stato preventivamente trattato con alcool etilico denaturato al 70%. Tutti gli strumenti di metallo non sterili sono stati sterilizzati alla fiamma di un becco Bunsen.



## 2.3 Piante di tabacco, di mais e microrganismi usati

Negli esperimenti sono state impiegate piante di *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN e piante di *Zea mays* L. Le piante di tabacco sono state micropropagate ed allevate in armadi di crescita alla temperatura di  $24 \pm 1$  °C e con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I nodi sono stati micropropagati ogni 30 giorni; il mais è stato coltivato in serra climatizzata. Per la manipolazione dei vettori è stato utilizzato il ceppo di *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Takara) e per la trasformazione genetica di tabacco è stato utilizzato il ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Ooms *et al.*, 1982).

## 2.4 Geni e vettori utilizzati

Nel presente lavoro sono stati utilizzati: a) il cDNA del gene *apoA-I* (Brewer *et al.*, 1978; Breslow., 1982) codificante per l'apolipoproteina A-I umana, clonato all'interno del *Multiple Cloning Site* (MCS) del plasmide pET-11a (Moffatt e Studier, 1986) tra i siti *NdeI* e *BamHI*; b) il cDNA del gene *apoA-I* (L174S) inserito nel vettore di clonaggio pGEM-T Easy (Promega). Entrambe le sequenze sono state fornite dalla prof.ssa Renata Piccoli (Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università di Napoli Federico II); c) il cDNA del gene *lcat* codificante l'enzima lecitina colesterolo aciltrasferasi fornito dal professor Guido Franceschini (Dipartimento di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano) inserito nel vettore plasmidico pGEM-T Easy (Promega).

I vettori utilizzati per il clonaggio e per l'espressione dei geni eterologhi in tabacco sono stati:

- pGEM T-Easy (Promega, figura 2.1 a);
- pG35S, derivato dal pJIT60 (Guerineau e Mullineaux, 1993). Esso reca il promotore costitutivo del gene 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), una regione che permette il clonaggio del gene d'interesse per la presenza di siti di restrizione unici (MCS), le sequenze di terminazione del gene 19S del CaMV (figura 2.1 b);
- pKYLX71:35S<sup>2</sup> (di seguito indicato con la sigla pKY), descritto da Schardl *et al.* (1987); recante il promotore costitutivo 35S modificato dalla presenza di una regione *enhancer* duplicata, una regione MCS, le sequenze di terminazione del gene della rubisco (*rbs*), il gene neomicina fosfotrasferasi (*npt II*) per la resistenza all'antibiotico kanamicina come marcatore selezionabile delle cellule di pianta transgeniche, con le sequenze promotrici e di terminazione del gene della nopalina sintasi (*nos*). La cassetta di espressione è inserita tra due sequenze fiancheggianti destra (RB) e sinistra (LB) del T-DNA (figura 2.1 c);
- pG0029 contenente, nel T-DNA, il gene *npt II*, mentre fuori dal T-DNA è presente il gene *npt I* di resistenza alla kanamicina per la selezione dei batteri (figura 2.1 d);
- pSoup. Il vettore è stato utilizzato per la co-trasformazione di *A. tumefaciens* con il vettore binario pG0029. La co-trasformazione è necessaria in quanto il pG0029 non possiede il gene codificante la replicasi (*repA*) responsabile dell'inizio della replicazione in *A. tumefaciens*, mentre questo è recato da pSOUP e codifica per una replicasi che, agendo in *trans*, riconosce come sito d'inizio replicazione la sequenza pSa-ORI presente nel vettore binario (figura 2.1 e).

## 2.5 Costruzione vettori di espressione e trasformazione di *A. tumefaciens*

I frammenti *apoA-I/93* e *apoA-I* sono stati ottenuti tramite reazione di amplificazione PCR del DNA plasmidico contenuto nel vettore pET::*apoA-I*, rispettivamente con le coppie di primer “73F-351R” e “73F-804R” (tabella 2.1) ottenendo così i siti di restrizione *Hind III* e *Sac I* rispettivamente al 5' ed al 3' delle sequenze amplificate. Le amplificazioni sono state fatte mediante l'enzima *Taq* Polimerasi “Pfu” in accordo con quanto suggerito dalla *Stratagene*. Le sequenze nucleotidiche sono state clonate, dopo digestione con gli opportuni enzimi, nel vettore binario pKY tra i siti di restrizione *Hind III* e *Sac I* mediante ligazioni effettuate in accordo con il protocollo consigliato dalla ditta produttrice del Kit (Invitrogen). I clonaggi sono stati verificati mediante analisi di amplificazione (PCR) del DNA dei vettori ottenuti secondo il protocollo descritto in seguito. I vettori binari pKYapoA-I e pKYapoA-I/93 sono stati introdotti nell'agrobatterio tramite elettroporazione (Cangelosi *et al.*, 1991). I cloni positivi alla selezione su kanamicina 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, rifampicina 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> e streptomycin 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, sono stati analizzati tramite analisi PCR del DNA.

I cDNA dei geni *apoA-I(L174S)* e *lcat*, sono stati sottoposti a digestione, rispettivamente, con le endonucleasi di restrizione *EcoRI* e *BamHI* (Promega), per isolare i frammenti d'interesse. I frammenti ottenuti sono stati isolati mediante corsa elettroforetica, purificati dal gel mediante l'uso del kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e clonati nel vettore pG35S, digerito con l'endonucleasi opportuna, mediante ligazione con la DNA ligasi T4 (Promega) usando un rapporto vettore/inserto 1/3. I pDNA estratti dai cloni di *E. coli* contenenti i plasmidi pG35S::*apoA-I(L174S)* e pG35S::*lcat* sono stati sottoposti a digestione con l'endonucleasi di restrizione *EcoRV* (Promega), per isolare la cassetta promotore-cDNA-terminatore d'interesse. I frammenti, isolati e purificati, sono clonati nel vettore pG0029.

Le diverse fasi del clonaggio sono state effettuate mediante cellule di *E. coli* ceppo DH5α, trasformate mediante protocollo *freeze-thaw* come riportato in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1987). L'inserimento dei costrutti di interesse nei vettori sono state verificate mediante analisi PCR con i primer specifici (tabella 2.2).

Per verificare la corretta sequenza dei frammenti amplificati mediante PCR è stato effettuato un sequenziamento mediante il *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem) impiegando il sequenziatore *3100 Genetic Analyzer* ABI PRISM disponibile presso il Dipartimento. Il sequenziamento è stato effettuato da personale addetto del Dipartimento.

La trasformazione delle cellule di *A. tumefaciens* è stata fatta mediante elettroporazione. Cinque micrometri della reazione di ligazione e 20 ng del plasmide pSoup sono stati aggiunti a 40 µl di cellule competenti. La soluzione è stata trasferita nella cuvetta e sottoposta ad impulso elettrico dell'intensità di 2,5 KV utilizzando l'elettroporatore “*E. coli PULSER*” della BioRad. Successivamente sono stati aggiunti 0,8 ml di substrato LB ai batteri e, dopo essere stati incubati a 28°C in agitazione per due ore, essi sono stati piastrati su LB solido contenente kanamicina 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Le piastre sono state incubate a 28°C per 48 ore.

Le cellule di *A. tumefaciens* trasformate sono state incubate per 48 ore su substrato solido contenente lattosio (10 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>), estratto di lievito (1 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>) e agar. Trascorse le 48 ore sulle colonie ottenute sono stati aggiunti 2ml di Reattivo di Benedict (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x 10 H<sub>2</sub>O 256 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>, Sodio Citrato 132 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>, CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 13,2 g<sup>l</sup><sup>-1</sup>). La presenza di un

alone giallo attorno alle colonie batteriche ha consentito di confermare la presenza di *A. tumefaciens*, dopo 10-15 minuti dall'aggiunta del reattivo.

## 2.6 Trasformazione transeunte e stabile di tabacco mediante *A. tumefaciens*

Per la trasformazione transeunte di *N. tabacum* è stata utilizzata la tecnica dell'agroinfiltrazione secondo il protocollo riportato da Yang *et al.* (2000). L'analisi Western è stata effettuata sulla proteine estratte dai tessuti agroinfiltrati secondo il protocollo riportato in seguito.

Giovani foglie di piante di tabacco allevate *in vitro* su substrato MS sono state usate per la trasformazione stabile in accordo con quanto riportato da Horsch *et al.* (1985). Le foglie tagliate in sezioni di 1 cm<sup>2</sup>, sono state trasferite in capsule Petri sterili contenenti 30 ml di sospensione batterica, incubate per 30 minuti a temperatura ambiente, asciugate su carta Whatman 3MM sterile ed infine poste su substrato RTE ed incubate a 26°C al buio. Dopo 48 ore le sezioni sono state trasferite su RTE addizionato con kanamicina (100 mg/l) e Claforan (500 mg/l, Duchefa) e poste nuovamente a 26°C per 3-4 settimane. I germogli trasgenici putativi differenziati, sono stati tagliati e trasferiti su MS addizionato con kanamicina 100 mg l<sup>-1</sup> e claforan 250 mg l<sup>-1</sup>, fino alla radicazione.

## 2.7 Reazione di amplificazione degli acidi nucleici

L'analisi di amplificazione del DNA è stata eseguita con l'impiego di un termociclatore PCR (BioRad). Il DNA genomico è stato estratto da foglie ben espanse di piante allevate *in vitro* seguendo il protocollo rapido di Edwards *et al.* (1991). Il DNA plasmidico è stato isolato mediante il Kit di estrazione QIAprep Midi (Qiagen). Per l'amplificazione del DNA sono stati impiegati *primer* specifici (tabella 2.1). Ciascuna reazione di amplificazione è stata condotta in 25 µl di una miscela di reazione secondo le istruzioni del Kit utilizzato (Invitrogen). Il programma di amplificazione adottato è stato il seguente:

- 1 ciclo: 94 °C per 5 minuti per ottenere la denaturazione del DNA;
- 30 cicli: 94 °C per 1 minuto, T °C per 1 minuto e 72 °C per 1 minuto;
- 1 ciclo: elongazione a 72 °C per 10 minuti.

Successivamente, i prodotti di amplificazione sono stati caricati su gel di agarosio all'1% contenente bromuro di etidio 40 ppm e sottoposti a migrazione elettroforetica (80 V per 60 minuti) in tampone TAE 1X (Tris acetato 4 mM; EDTA 1 mM). Il gel è stato osservato mediante analizzatore d'immagine a raggi UV (BioRad) e fotografato. Le dimensioni degli amplificati ottenuti, espresse in coppie di basi (cb), sono state valutate per confronto con quelle di un marcatore avente numero di basi noto.

## 2.8 Analisi RT-PCR

Per l'estrazione di RNA da pianta è stato utilizzato lo "RNeasy plant mini kit" della Qiagen. Il metodo si basa sull'uso di una soluzione di estrazione contenente guanidina isotiocianato (Chomczynski e Sacchi, 1987) e la separazione dell'RNA totale mediante cromatografia di scambio su colonne di gel di silice. La purezza e le

concentrazioni di RNA nei campioni estratti è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro, in base al rapporto dell'assorbanza della soluzione contenente l'acido nucleico ed eventuali contaminanti nelle lunghezze d'onda 260 e 280nm. Per valutare la presenza di messaggi del transgene, è stata eseguita un'analisi "RT-PCR" (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*). Nella prima fase è stata effettuata una reazione di retrotrascrizione per la sintesi del cDNA totale utilizzando l'enzima "Super Script II reverse transcriptase" secondo il protocollo suggerito (Invitrogen).

Per l'analisi RT-PCR sono stati impiegati oltre alla coppia di primer specifici per il cDNA di interesse, un'altra relativa al gene codificante la subunità 18S dell'RNA ribosomiale utilizzata come controllo. Due microlitri del cDNA per ciascun campione sono stati utilizzati per le reazioni di amplificazione condotte secondo il protocollo precedentemente descritto. Come controllo negativo è stato utilizzato il cDNA di una pianta di tabacco non trasformata.

## 2.9 Estrazione delle proteine solubili totali e quantificazione delle proteine totali estratte

Giovani foglie (tabacco) e semi (mais) prelevati da piante transgeniche e non allevate in vaso, sono state triturate in presenza o assenza di azoto liquido ed utilizzate per l'estrazione delle proteine solubili totali. Il tessuto triturato è stato pesato e addizionato con il *protein extraction buffer 1* (per il tessuto fogliare, in accordo con il protocollo di Nagel *et al.*, 1992) oppure con il *protein extraction buffer 2* (per i semi di mais: NaCl 500 mM, acido ascorbico 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% v/v, pH 8) in rapporto 1:2 (p/v). Dopo centrifugazione (10 minuti a 13000 rpm, 4°C), il surnatante recuperato è stato conservato a -20°C fino alle analisi successive.

Le proteine totali estratte sono state quantificate mediante saggio Bradford (Bradford, 1976). Gli standard per la costruzione della retta di taratura sono stati preparati con la albumina di siero bovino (BSA, da 0,5 a 5  $\mu$ g). I campioni da controllare (2  $\mu$ l e 4  $\mu$ l) sono stati addizionati a 200  $\mu$ l di una soluzione diluita 1/5 di reagente Bradford e dopo 5 minuti è stata letta l'assorbanza mediante spettrofotometro a 595nm. La concentrazione proteica è stata calcolata confrontando l' $OD^{595nm}$  di ciascun campione con  $OD^{595nm}$  della retta di taratura ottenuta con le letture dello standard (BSA).

## 2.10 Separazione elettroforetica delle proteine totali (SDS-PAGE) e analisi Western

Le proteine estratte sono state addizionate con il *loading buffer* e denaturate incubando i campioni ad una temperatura di 100°C per 10 minuti). I campioni proteici sono separati mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide e sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE al 12%) seguendo il protocollo standard (Sambrook *et al.*, 1989). A fine SDS-PAGE le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham). Al termine del trasferimento la membrana è stata bloccata mediante proteine del latte al 5% (p/v) in PBST, 1 ora a temperatura ambiente) e incubata nell'Ab1 (1:3.000- $\alpha$ po; 1:3.000-lcat; 1:5.000-phsl). Dopo la reazione con l'anticorpo specifico, il filtro è stato trattato con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi (Opti 4CN Detection Kit, Goat-anti-Rabbit; Biorad) ad una diluizione 1:3.000 in tampone TBS con l'1% di proteine del latte per 1,5 ore. Al fine di

evidenziare la proteina transgenica, la membrana è stata infine lavata e sottoposta a reazione colorimetrica attraverso l'impiego delle soluzioni fornite dal Kit stesso contenenti 4-cloro-1-naftolo come substrato per la perossidasi.

**Protein loading buffer 6x:** 8% (p/v) SDS, 40% (v/v) glicerolo, 200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.05% (p/v) blu di bromofenolo.

**Tampone di corsa elettroforetica:** 25 mM Tris; 192 mM glicina; 0.5% (p/v) SDS.

**Tampone di trasferimento:** 25 mM Tris; 192 mM glicina; 0.5% (p/v) SDS; 20% (v/v) metanolo.

**PBS-T, Phosphate-Buffered Saline Tween<sub>20</sub> solution (pH 7.4):** 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1% (v/v) Tween<sub>20</sub>.

## 2.11 Preparazione dei campioni per le analisi immunoistochimiche

Foglie, fusti e semi sono stati tagliati in piccole sezioni, e fissate per almeno 16 ore in una soluzione contenente 4% (p/v) formaldeide, 0.2% (v/v) glutaraldeide in PB 0,1 M, pH 7.4) a 4°C. Successivamente le sezioni sono state lavate (15 minuti per 5 volte) con PB 0,1 M (pH 7.4) a 4°C, disidratate mediante passaggi in etanolo al 50% (v/v, 4°C per 30 minuti), al 70% (v/v, -20°C per 30 minuti), 96% (v/v, -20°C per 30 minuti) ed in etanolo assoluto (-20°C per 30 minuti), ed infiltrate nella resina LR White (London Resin Company Ltd, UK), addizionata con 0.5% (p/v) di benzoin metil etere (3:1, 1:1, 1:3 etanolo:resina (v/v), per 1 ora ciascuno e resina al 100% per almeno 16 ore a -20°C. Le sezioni infiltrate sono state trasferite in capsule Beem (SPI) pre-raffreddate, riempite con resina fresca e lasciate polimerizzare in presenza di luce UV a -20°C per 24 ore. Per osservare la struttura cellulare le sezioni sono state preparate come descritto sopra ma fissate per almeno 16 ore in una soluzione contenente 2% (p/v) formaldeide, 2,5% (v/v) glutaraldeide in PB 0,1 M, pH 7.4) a 4°C. Successivamente le sezioni sono state lavate (15 minuti per 5 volte) con PB 0,1 M (pH 7.4) a 4°C ed incubate in tetrossido di osmio (1% in PB 0,1 M e  $\text{KFeCN}$  0,8 %) per 3 ore a 4°C. Successivamente le sezioni sono state nuovamente lavate (15 minuti per 5 volte) con PB 0,1 M (pH 7.4) a 4°C e disidratate in acetone 50% (1 volta), 70% (2 volte), 90% (3 volte) e 96% (3 volte) per 10 minuti ogni passaggio, e, infine, 100% (3 volte per 15 minuti ciascuna). Dopo la disidratazione i campioni sono stati infiltrati nella resina Spurr (3:1 acetone:resina (v/v), per almeno 16 ore a 4°C, 1:1 (v/v) e 1:3 per 2-3 ore ciascuno a 4°C, 100% per 3 ore a 4°C). Le sezioni infiltrate sono state trasferite in capsule Beem (SPI) riempite con resina fresca e lasciate polimerizzare a 60°C 48 ore. Infine i campioni sono stati tagliati in sezioni da 100 nm (per l'EM) o da 1  $\mu\text{m}$  (per il microscopio ottico) mediante l'ultramicrotomo *Ultracut E* (Leica) e raccolte su griglie d'oro ricoperte con il Formvar (*200 mesh gold grids*, Sigma). La colorazione con il rosso Congo è stata fatta secondo le indicazioni di Puchtler e Sweat (1965)

**PB, Phosphate-Buffered solution 0,1 M (pH 7.4):** 190 ml di 200 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 810 ml di 9.9 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

## 2.12 Immunolocalizzazione

Le griglie recanti le sezioni sono state bloccate in gocce di BSA 5% (p/v) in PB (0,1 M, pH 7.4) per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente esse sono state incubate con l'Ab1 opportuno (1/300) in PB (0.1M, pH 7.4) per almeno 16 ore a 4°C, lavate con PB-T 0,1 M ed incubate con l'Ab2 coniugato a particelle d'oro del diametro di 10 nm (Molecular Probes), diluito 1:30 in PB (1 ora a temperatura ambiente). L'Ab1 è stato pre-trattato con tessuto del controllo triturato per 15 minuti per impedire il riconoscimento non specifico da parte dell'Ab1. Infine le griglie sono state lavate in acqua distillata, asciugate all'aria, trattate con una soluzione acquosa al 2% (p/v) di acetato di uranile per 15 minuti, lavate nuovamente in acqua distillata ed osservate al microscopio elettronico (TEM Philips EM 400 a 80 kV).

Per l'osservazione al microscopio a fluorescenza i campioni sono stati preparati come già descritto, e le sezioni da 1 µm ottenute sono state trasferite su vetrini portaoggetti e trattate come sopra riportato. L'anticorpo secondario Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) è stato usato in una diluizione 1:30 in PB (0,1 M, pH 7.4). Le sezioni sono state infine lavate con PB e acqua distillata, ed osservate al microscopio a fluorescenza (Olympus BX40).

**PB-T**, *Phosphate-Buffered Tween<sub>20</sub> solution* 0,1 M (pH 7.4): 190 ml di 200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O e 810 ml di 9.9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O.

## 2.13 Valutazione del numero di copie del transgene

La valutazione del numero di copie del transgene è stata eseguita mediante analisi di segregazione del carattere resistenza alla kanamicina (kan+). Cento semi per ciascuna linea trasgenica sono stati posti a germinare su substrato MS e incubati alla temperatura di 24±1 °C, al buio. Dopo 20 giorni ciascuna piantina è stata propagata *in vitro* e lasciata radicare nuovamente su substrato MS, addizionato con kanamicina (150mg/l). A radicazione avvenuta è stato rilevato il numero delle piantine radicate sul totale di piantine ottenute.

## 2.14 Stima quantitativa delle proteine ricombinanti espresse in tabacco

Una stima della quantità di proteine totali estratte dalle piante di tabacco transgeniche è stata fatta mediante saggio di Bradford. Successivamente è stato possibile eseguire una stima per confronto approssimativo tra l'intensità della banda corrispondente al campione puro ApoA-I o LCAT, e le bande corrispondenti alle proteine ricombinanti espresse nelle piante transgeniche. Le quantità di proteina ricombinante sono state calcolate sulla base dei dati fotometrici della densità della banda per confronto con i dati fotometrici ottenuti da soluzioni con quantità note della proteina in esame, utilizzando il programma di analisi grafica "Image Processing and Analysis in Java".

## 2.15 Rilievo dei dati morfometrici

Tre cloni per ciascuna linea trasformata sono stati trasferiti *in vivo*. Al fine di stabilire eventuali variazioni fenotipiche nelle piante geneticamente trasformate, rispetto alla pianta controllo non trasformata, sono stati scelti i seguenti parametri biometrici di comparazione:

- Altezza del fusto della pianta dal primo nodo basale al primo nodo apicale a 15 giorni dal trapianto *in vivo* con misurazione accurata al mezzo centimetro.
- Lunghezza delle foglie basali più vicine al colletto a 15 giorni di età, misurando la distanza tra il picciolo e la punta della foglia.
- Larghezza delle foglie basali più vicine al colletto a 15 giorni di età considerando come larghezza il segmento trasversale passante per il centro stesso della foglia.
- Numero di nodi intercorrenti tra colletto ed apice a 15 giorni di età, nodi estremi inclusi.

È stata, inoltre, eseguita una valutazione complessiva delle piante al raggiungimento dello stato di senescenza e quindi alla fine del suo ciclo biologico. Tale valutazione ha riguardato la forma delle foglie e la presenza di infiorescenze.

## 2.16 Analisi statistica dei dati sperimentali

Tutti i valori riportati sono le medie di almeno 3 esperimenti indipendenti. I dati sperimentali sono stati elaborati attraverso analisi statistica con l'ausilio del programma SyStat (Wilkinson *et al.*, 1992) versione 10.2 per computer Windows. Per valutare il numero di copie del transgene il numero di piante resistenti alla kanamicina osservato per ciascuna linea transgenica è stato confrontato con il numero atteso nell'ipotesi di una segregazione 3:1 e 15:1 mediante test  $\chi^2$ .

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Analisi *in silico*

Prima di procedere con la costruzione dei vettori di espressione in pianta, è stata condotta un'analisi preliminare *in silico* mediante l'ausilio di programmi bioinformatici. Per valutare la presenza di correlazioni strutturali e funzionali, l'allineamento della sequenza aminoacidica dell'ApoA-I con le sequenze polipeptidiche di origine vegetale presenti nella banca dati "*Viridiplantae*", ha evidenziato solo 5 polipeptidi con una percentuale di similarità aminoacidica superiore al 20% e un *E-value* inferiore a 0,05 (tabella 3.1). Dall'allineamento è risultata una regione comune in tutti i polipeptidi, compresa tra il residuo 96 e il residuo 177 della ApoA-I, ma non è stata evidenziata alcuna omologia di funzione (figura 3.1).

E' stata eseguita un'ulteriore analisi *in silico* per la predizione della localizzazione cellulare della proteina, per il riconoscimento di peptidi segnali e di eventuali siti di proteolisi, per siti di glicosilazione o per altre modifiche post-traduzionali in pianta. Tale analisi è stata eseguita sia sulla proteina completa, provvista del pre- e del pro-peptide, sia sulla proteina matura, correttamente proteolizzata.

Dall'esame è risultato che il pre-peptide (costituito da 18 aminoacidi) della proteina viene correttamente riconosciuto come tale anche in pianta. Il pro-peptide (6 residui aminoacidici) non è riconosciuto. L'analisi ha anche evidenziato che in pianta non sono riconosciuti siti per la glicosilazione o per altre modificazioni post-traduzionali. Infine, la proteina sprovvista del pre-pro-peptide, presenta il 45% di probabilità di essere accumulata in ambiente citoplasmatico (tabella 3.2).

Dalle analisi *in silico* effettuate sulla sequenza aminoacidica dell'enzima LCAT, è apparsa evidente la presenza in pianta di proteine LCAT-like. In base alla percentuale d'identità di sequenza e di struttura, è stato possibile costruire un dendrogramma che rappresenta la distanza filogenetica delle proteine vegetali LCAT-like da quella umana. Tra le proteine omologhe identificate, la LCAT-like espressa in *Oryza sativa*, con una percentuale di identità aminoacidica pari al 28%, sembra quella più vicina all'enzima umano (figura 3.2).

L'analisi per la predizione dei siti segnale responsabili della localizzazione della proteina nella cellula vegetale, ha evidenziato una probabilità del 54% (tabella 3.2) che l'enzima ricombinante si accumuli preferenzialmente nello spazio extracellulare (apoplasto). Per quel che concerne i siti di glicosilazione, il programma "PSORT" ha mostrato che le sequenze segnale presenti sulla sequenza della LCAT dovrebbero essere riconosciute anche in pianta e, quindi, l'enzima dovrebbe presentare il corretto numero di catene glicosidiche.

Infine, è stata effettuata un'analisi del *codon usage* di *Nicotiana tabacum* e di *Homo sapiens* allo scopo di valutare la percentuale di preferenza d'uso delle triplette nucleotidiche codificanti per lo stesso aminoacido. Come mostrato in figura 3.3 la differenza percentuale media tra il *codon usage* umano e quello di tabacco è risultato essere solo dell'11,8%. Le differenze maggiori sono state evidenziate per i codoni GCC, CAA e CTG (rispettivamente Ala, Gln e Leu), che nell'uomo sono preferiti rispettivamente 40, 26 e 40 volte su 100, mentre in tabacco 17, 56 e 12 volte.



## 3.2 Costruzione dei vettori binari e trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens*

### 3.2.1 Costruzione dei vettori binari

In figura 3.4 sono riportate le mappe schematizzate delle cassette d'espressione costruite per i diversi frammenti nucleotidici.

Le sequenze nucleotidiche di *apoA-I* e *apo93*, sono state ottenute mediante amplificazione del DNA plasmidico, isolato da *E. coli*, contenente il vettore pET-11a::*apoA-I*, con le coppie di *primer* "73F/351R" e "73F/804R". I pesi molecolari degli amplificati rispettano quelli attesi: circa 750 cb per la sequenza completa, privata della regione codificante il pre-pro-peptide e circa 300 cb per la sequenza codificante il frammento di 93 aminoacidi. I prodotti di amplificazione ottenuti, eluiti dal gel, opportunamente digeriti e clonati nel vettore pKYLX71:35S<sup>2</sup>, sono stati usati per trasformare il ceppo DH5 $\alpha$  di *E. coli*.

L'analisi di amplificazione eseguita sulle colonie di *E. coli*, ottenute in seguito alla trasformazione con i prodotti di ligazione pKY::*apo93* e pKY::*apoA-I* ha verificato la presenza di colonie positive (figura 3.5). Per il frammento *apo93*, di dimensioni minori, l'analisi di amplificazione non ha evidenziato la presenza di concatameri che avrebbero potuto formarsi nel corso della reazione di ligazione,. Infine il sequenziamento dei prodotti d'interesse, per ciascun costrutto ottenuto a seguito della trasformazione, non ha rivelato alterazioni rispetto alla sequenza nucleotidica originale.

I cDNA dei geni *apoA-I(L174S)* e *lcat* sono stati preliminarmente clonati nel vettore pGEM-Teasy. In figura 3.6 sono mostrati i prodotti della digestione dei pDNA estratti da colonie di *E. coli*, ottenuti in seguito alla trasformazione con i prodotti di ligazione pGEM::*apo(L174S)* e pGEM::*lcat*. Nelle colonie saggiate sono stati evidenziati i frammenti da circa 900 e 1.400 cb corrispondenti ai cDNA di interesse. Prima di procedere con i clonaggi successivi è stato effettuato un sequenziamento del frammento *apo(L174S)* per verificare la presenza della mutazione in corrispondenza della lisina 174. In figura 3.7 è riportato parte del cromatogramma ottenuto a seguito del sequenziamento del prodotto d'interesse. Come evidenziato in figura, il sequenziamento ha mostrato la presenza del codone GCT (serina) atteso in sostituzione del codone CAA (lisina) presente nell'*apoA-I wild type*.

Verificata la presenza della mutazione del frammento *apoA-I(L174S)*, si è proceduto con il clonaggio dei cDNA di interesse, opportunamente digeriti ed eluiti dal gel, nella cassetta promotore-terminatore del vettore p35S nei siti di restrizione unici *EcoRI* (*apoA-I(L174S)*) e *BamHI* (*lcat*). L'analisi d'amplificazione eseguita con i *primer* specifici sul pDNA di alcune colonie di *E. coli*, ottenute in seguito alla trasformazione con i prodotti di ligazione *p35S::apoA-I(L174S)* e *p35S::lcat*, ha mostrato la presenza di ampliconi dal peso molecolare atteso. In figura 3.8, è riportata l'analisi di amplificazione effettuata sul pDNA di alcune colonie ottenute a seguito della trasformazione con il prodotti di legazione *p35S::apoA-I(L174S)*, usando un *primer forward* specifico per il promotore 35S ed uno *reverse* specifico per la *apoA-I(L174S)*. In 2 delle 9 colonie saggiate, il peso molecolare delle bande ottenute rispetta quello atteso: 1.100 cb di cui circa 750 cb del promotore 35S ed i primi 350 nucleotidi dell'*apoA-I(L174S)*. La presenza di tale amplificato ha permesso di identificare le colonie di *E. coli* trasformate con il vettore *p35S::apo(L174S)* in cui il

frammento si è integrato con il corretto orientamento rispetto alla cassetta promotore-terminatore.

Una verifica mediante digestione enzimatica con gli enzimi *EcoRV* e *KpnI* ha, invece, permesso l'identificazione univoca del corretto orientamento del frammento *lcat*, rispetto alla cassetta promotore-terminatore. Come riportato in figura 3.9 e 3.10, nei campioni 2, 9, 28 e 40 sono presenti bande che indicano la presenza del frammento inserito nel giusto orientamento. Le cassette d'espressione P35S-*apoA-I*(L174S)-T19S e P35S-*lcat*-T19S, isolate dai vettori mediante digestione con l'enzima *EcoRV*, sono state clonate nel vettore d'espressione pG0029. I risultati dell'analisi d'amplificazione, effettuata con i *primer* specifici Apo1F/Apo1R e LCATF2/LCATR2 mostrano la presenza di amplificati in corrispondenza dei pesi molecolari attesi ( $\approx 300$  cb e  $\approx 400$  cb), confermando la presenza dei frammenti *apoA-I*(L174S) e *lcat* e, quindi, delle cassette d'espressione.

### 3.2.2 Trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens*

Il DNA plasmidico di colonie contenenti i costrutti pKY::*apoA-I*, pKY::*apo93*, pG0029::*apoA-I*(L174S) e pG0029::*lcat* è stato isolato e utilizzato per trasformare ceppi LBA4404 di *A. tumefaciens* contenenti il plasmide Ti helper pAL4404. L'analisi di amplificazione mediante *primer* specifici, su colonie ottenute da ciascuna trasformazione, e cresciute su substrato selettivo, ha evidenziato la presenza dei vettori di espressione nei ceppi di agrobatterio trasformati e, quindi, delle cassette di espressione di interesse (figura 3.11). Ai ceppi di *A. tumefaciens* ottenuti è stato assegnato il nome di: AT*apoA-I*, AT*apo93*, AT*apo174* e AT*lcat*.

### 3.3 Trasformazione di *Nicotiana tabacum*

Per quanto concerne il ceppo AT*lcat* di *A. tumefaciens*, prima di procedere con la trasformazione stabile di tabacco, è stata eseguita una trasformazione transeunte attraverso agro-infiltrazione dei tessuti della pianta sufficiente a stimare la correttezza o meno dell'intera strategia di clonaggio e dunque dell'espressione del prodotto genico. L'analisi *Western blot* (figura 3.12), condotta su proteine totali estratte da foglie dopo 2 giorni dall'agroinfiltrazione, ha rivelato la presenza dell'enzima LCAT confermando la corretta espressione del transgene nella pianta. Il peso molecolare della LCAT espressa in pianta è stata stimata intorno ai 55 kDa, mentre la LCAT umana produce una banda di migrazione il cui peso molecolare è stimato intorno ai 70 kDa.

I ceppi di *A. tumefaciens*, AT*apoA-I*, AT*apo93*, AT*apo174* e AT*lcat* sono stati utilizzati per trasformare stabilmente il genoma nucleare di piante di *N. tabacum* cv Samsun NN. I risultati della trasformazione sono mostrati in tabella 3.3.

Dopo 45 giorni di coltura *in vitro* in presenza di antibiotico il 25-30% degli espianti co-coltivati ha mostrato formazione di callo. Di tali espianti, il 23% ed il 27% ha differenziato germogli rispettivamente per i costrutti *apo93* e *apo174*. Per gli espianti co-coltivati per i costrutti *apoA-I* e *lcat*, invece, le percentuali di espianti differenzianti germogli sono state del 9% e del 4%, mostrando, quindi, differenze statisticamente significative rispetto al numero di espianti differenzianti germogli osservato per gli altri 2 costrutti.

In figura 3.13 sono mostrati alcuni espianti differenzianti germogli derivanti dalla co-coltura con i diversi ceppi. Dopo 45 giorni dalla co-coltura, i germogli putativi

trasgenici per *apo93*, hanno mostrato inizialmente una crescita lenta e ridotta (figura 3.13c) per poi svilupparsi, successivamente, in modo normale (figura 3.14).

I germogli ottenuti in seguito al differenziamento dalle diverse co-colture sono stati posti a radicare su mezzo selettivo. Di 17 germogli ottenuti dalla co-coltura con *ATapoA-I*, 10 hanno radicato. Per la co-coltura con *ATapo93*, invece, tutti i germogli differenziati hanno radicato su mezzo selettivo. Dalla co-coltura con il ceppo *ATapo174*, sono stati ottenuti 40 germogli, dei quali 27 hanno radicato su substrato selettivo. I germogli vitali ottenuti dalla co-coltura con il ceppo *AT $\beta$ cat* hanno mostrato una crescita piuttosto lenta con particolare difficoltà nella radicazione. Solo successivamente le piantine si sono sviluppate in maniera normale rispetto al controllo. Una sola piantina ha mostrato un notevole ritardo nei tempi di radicazione rallentando di molto anche lo sviluppo complessivo degli organi epigei. Alle piante putative transgeniche ottenute è stato assegnato il codice: Ap, per il gene *apoA-I*; A93, per il frammento *apo93*; AM, per il gene *apoA-I(L174S)* e LC, per il gene *lcat*.

### 3.4 Analisi molecolari delle piante putative transgeniche

#### 3.4.1 Analisi di amplificazione del DNA genomico

Per verificare l'effettiva trasformazione delle piante con i costrutti d'interesse, è stata eseguita un'analisi di amplificazione sul DNA genomico estratto dalle piante radicate su mezzo selettivo con i *primer* specifici per ciascun costrutto. L'analisi di amplificazione (figura 3.15) ha mostrato che tra le piante putative transgeniche ottenute, era presente un amplificato con corretto peso molecolare in 7 delle 10 piante trasformate per la *ApoA-I*, in tutte le 8 piantine A93 radicate in presenza di kanamicina e in 18 delle 27 piante AM ottenute a seguito della trasformazione di tabacco con il ceppo *ATapo174*. Tali risultati hanno confermato l'integrazione dei geni *apoA-I*, *apo93* e *apoA-I(L174S)* nel genoma nucleare di tabacco. Infine l'analisi di amplificazione effettuata per valutare l'integrazione del cDNA di *lcat* (figura 3.15d) ha mostrato che, delle 11 piantine radicate in presenza di kanamicina, 6 presentavano un amplicone delle dimensioni attese ( $\approx 400$  cb). Tutte le piantine risultate non positive all'analisi di amplificazione sono state considerate non trasformate e quindi non sottoposte alle analisi successive.

#### 3.4.2 Analisi di trascrizione dei transgeni

La trascrizione dei transgeni è stata verificata mediante analisi RT-PCR su RNA totale estratto dal tessuto fogliare di piante risultate positive alla precedente analisi PCR. Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA estratto è stato controllato mediante amplificazione del gene codificante le subunità 18S dell'RNA ribosomiale, costitutivamente espresso in tutti i tessuti. Come mostrato in figura 3.16, è presente un amplicone in tutti i campioni analizzati: ciò ha confermato la presenza del cDNA. Verificata la presenza dei cDNA totali, è stata eseguita un'analisi RT-PCR su tutti i campioni con i *primer* specifici per ciascun frammento. Come mostrato in figura 3.17a e b, in tutte le 7 piante Ap ed in 4 delle 8 piantine A93, è stata evidenziata la presenza del trascritto. In figura sono riportati anche i risultati dell'analisi effettuata sulle piante transgeniche AM ed LC. Come mostrato in figura, in 15 delle piantine

saggiate è stata evidenziata la presenza del trascritto del gene *apoA-I(L174S)* mentre la trascrizione del gene *lcat* è stata evidenziata in 6 tra le piantine saggate.

### 3.4.3 Analisi di espressione dei transgeni

I risultati delle analisi western, utilizzate per verificare l'espressione dei polipeptidi ricombinanti, sono riportati in figura 3.18. L'anticorpo usato non ha evidenziato la presenza della proteina eterologa nelle piante transgeniche A93 (figura 3.18b) mentre ha rivelato la presenza dell'ApoA-I in tutte le piante trasformate saggate. In tali piante, il peso molecolare osservato risulta essere di circa 25 kDa e l'altezza delle bande corrisponde esattamente all'altezza della banda della proteina purificata usata come controllo positivo.

Per le piante in cui è stato evidenziato il trascritto del gene *apoA-I(L174S)*, l'anticorpo ha rivelato la presenza della proteina eterologa in 12 piantine transgeniche. Anche in questo caso, il peso molecolare osservato e la migrazione delle bande di rivelazione corrisponde esattamente a quella della banda della proteina purificata usata come controllo positivo. Infine per il gene *lcat*, l'espressione dell'enzima è stata osservata in tutte le 6 piantine saggate (figura 3.18d). Il peso molecolare osservato risulta essere circa 48 kDa e la migrazione delle bande di rivelazione risulta differente rispetto a quella della banda della proteina purificata usata come controllo positivo stimata intorno ai 70 kDa.

## 3.5 Valutazione di caratteri fenotipici

Come si può evidenziare dalla figura 3.19, le piante esprimenti la ApoA-I, quelle trasformate per l'espressione del mutante amiloidogenico ApoA-I(L174S) e per l'enzima LCAT, non presentano differenze morfologiche evidenti rispetto alle piante non trasformate. Dopo 15 e 30 giorni dal trasferimento *in vivo*, è stata eseguita un'analisi statistica di alcuni dati morfologici su piante esprimenti le proteine ricombinanti e dei controlli non trasformati della stessa età, utilizzati come controllo negativo. I dati riportati in tabella 3.4, non hanno evidenziato differenze sostanziali tra le piante transgeniche Ap ed i controlli. Tra le piante esprimenti l'enzima LCAT, non vi sono differenze significative rispetto alla pianta controllo. Una sola pianta, contrassegnata con il codice LC13, ha mostrato un fenotipo nano (figura 3.19h) e, come evidenziato in tabella 3.5, l'analisi dei dati morfologici condotta dopo 15 giorni di coltura *in vivo* sulle 6 piante saggate ha confermato quanto osservato: la piantina LC13 mostra, infatti, dei valori di larghezza e lunghezza delle foglie, ed altezza della pianta dal primo nodo basale al primo nodo apicale, che si allontanano dalla media delle distribuzioni dei dati di tutte le altre piante in modo significativo, mentre, non vi sono differenze significative nel numero di nodi intercorrenti tra l'apice ed il colletto.

## 3.6 Valutazione del numero di copie del transgene

In tabella 3.6, sono riportati i risultati dell'analisi di segregazione del carattere resistenza alla kanamicina, effettuata sulla progenie T<sub>1</sub> delle piante trasformate. Dall'analisi del  $\chi^2$  risulta che nelle piante Ap11, Ap12, AM37, LC2, LC18 e LC34 si siano integrate 2 copie del transgene poiché il risultato del test del  $\chi^2$  non differisce in modo significativo dall'ipotesi di una segregazione 15:1 del carattere in esame. Per le

piante Ap13, Ap15, Ap17, Ap18, AM40, AM51, AM54, AM57, LC6, LC13 e LC27 appare altamente significativa l'ipotesi di una segregazione di tipo 3:1 associata, invece, all'integrazione di una singola copia del transgene.

### **3.7 Stima quantitativa delle proteine ricombinanti espresse in *N. tabacum***

Una stima della quantità di proteine totali estratte dalle piante di tabacco transgeniche è stata fatta per confronto tra l'intensità della banda corrispondente al campione puro ApoA-I o LCAT, e le bande corrispondenti alle proteine ricombinanti espresse nelle piante transgeniche rilevate dall'analisi Western. La quantità stimata di ApoA-I espressa nelle piante Ap e del mutante espresso nelle piante AM, è risultata compresa tra lo 0,01% e lo 0,05% del TSP. Per quanto concerne l'enzima, la LCAT presente in ciascun campione saggiato è risultata essere compresa tra lo 0,02% e lo 0,06% del TSP.

### **3.8 Stima della quantità e della stabilità della ApoA-I ricombinante espressa nelle piante Ap-T<sub>1</sub>**

Alcune piante della progenie T<sub>1</sub> sono state saggiate mediante analisi Western. Tali analisi, come mostrato in figura 3.20, hanno permesso di verificare che la proteina in esame è espressa in modo stabile anche nella generazione successiva; inoltre il peso molecolare rispetta quello atteso e non sono presenti prodotti tronchi.

La quantità di proteina espressa nelle piante T<sub>1</sub> varia tra lo 0,01% e lo 0,05% del TSP, in accordo con quanto osservato per i parentali T<sub>0</sub>. Alcune piante, quali la Ap15-2, la Ap18-9, Ap18-19 e la Ap18-91, hanno mostrato un'espressione maggiore raggiungendo valori compresi tra lo 0,07% e lo 0,09% del TSP. Tali valori sono superiori a quelli osservati nelle piante Ap15 e Ap18 della generazione precedente. In tali piante Ap-T<sub>1</sub> è stato inoltre osservato un fenotipo alterato (figura 3.21). Come mostrato in foto le piante Ap-T<sub>1</sub> presentano un margine fogliare "ondulato" non presente nella pianta non trasformata. Una ulteriore analisi western sulle proteine totali solubili estratte da tessuto fogliare, prelevato da palchi diversi, e da fusto, ha permesso di valutare la stabilità della ApoA-I ricombinante nel tempo. In figura 3.22, è riportato il risultato di tale analisi. L'espressione della proteina sembra essere maggiore nei tessuti più giovani (germogli, corsia 8), e risulta stabile nel tempo. Infatti, il segnale osservato nell'estratto proteico ottenuto da foglie in senescenza (completamente ingiallite) è di poco inferiore a quello osservato nell'estratto ottenuto da foglie giovani (corsia 4 e 7). Anche nel fusto, la proteina è espressa in quantità simili in sezioni prelevate da diversa altezza.

Essendo la ApoA-I una *lipid binding protein* è stata effettuata un'analisi Western sulla frazione idro- e lipo-solubile e sul rifiutato, delle proteine totali estratte da una pianta Ap-T<sub>1</sub>, per valutare se la ApoA-I ricombinante fosse o meno legata ai lipidi di membrana. Come mostrato in figura 3.23, la presenza della ApoA-I ricombinante è stata evidenziata solo nella frazione idrosolubile. La proteina è stata individuata anche nel rifiutato, indicandone una perdita parziale durante le normali fasi di estrazione proteica.

### **3.9 Ottenimento di colture cellulari liquide da tessuto fogliare di piante esprimenti la ApoA-I**

Dalle piante Ap15-2, Ap18-9, Ap18-19, Ap18-92 (che esprimono quantità maggiori di ApoA-I ricombinante) e NN00 (C-) sono state ottenute colture cellulari liquide (figura 3.24a), al fine di valutare se la proteina fosse secreta nel mezzo liquido. Come evidenziato in figura (3.24b) l'analisi Western, effettuata sulle proteine secrete nel mezzo liquido dalle cellule di tabacco transgenico, precipitate mediante ammonio solfato saturo, mostra la presenza della ApoA-I. La proteina secreta nel mezzo liquido presenta un peso molecolare maggiore, stimato intorno ai 74 kDa, rispetto a quello atteso.

### **3.10 Purificazione della ApoA-I espressa in foglie di tabacco**

Per stimare la quantità di proteina ricombinante che è possibile purificare da tabacco, le proteine totali solubili, estratte da tessuto fogliare di piante esprimenti la ApoA-I ricombinante, sono state caricate su una colonna di immuno-affinità. In figura 3.25 è riportata la foto di una corsa elettroforetica delle frazioni ottenute mediante cromatografia dopo colorazione con il blu di coomassie ed un'analisi Western eseguita sulle medesime frazioni. Come mostrato in figura l'anticorpo evidenzia una banda nelle corsie 7 e 8 (figura 3.25b) indicando la presenza dell'ApoA-I ricombinante nelle frazioni eluite dalla colonna. La quantità di proteina purificata estratta è stata stimata essere intorno a 0,2µg/g di tessuto fogliare fresco.

### **3.11 Localizzazione cellulare della ApoA-I espressa in tabacco**

#### **3.11.1 Colorazione con blu di toluidina**

Prima di procedere con le analisi immuno-istochimiche, alcune sezioni di tessuto fogliare (1100nm) sono state colorate con il blu di toluidina per valutare la presenza di alterazioni cellulari rispetto al controllo negativo. In figura 3.26 sono riportati dei particolari del tessuto lacunoso di foglie prelevate da piante Ap. L'analisi non ha evidenziato differenze rispetto al controllo in nessuna delle sezioni osservate. La presenza delle proteine ricombinanti sembra quindi non alterare la morfologia cellulare rispetto alla pianta non trasformata.

#### **3.11.2 Localizzazione cellulare**

L'analisi immuno-istochimica effettuata su sezioni ottenute da foglie transgeniche Ap e da tessuto fogliare di piante non trasformate, ha permesso di escludere la presenza di segnali dovuti a legame aspecifico dell'anticorpo usato. L'osservazione al microscopio a fluorescenza delle sezioni di piante Ap, ha evidenziato la presenza, e quindi, l'accumulo della proteina ricombinante nel citoplasma (figura 3.27). Per confermare quanto osservato, l'immuno-localizzazione della ApoA-I è stata fatta anche su sezioni da 90nm che sono poi state osservate al microscopio elettronico.

L'osservazione al microscopio elettronico, ha confermato la presenza della proteina nel citoplasma, inoltre, come riportato in figura 3.28, le particelle di oro sono presenti anche nei vacuoli e nell'apoplasto.

### **3.12 Localizzazione del mutante ApoA-I(L174S) e fibrillogenasi in tessuto fogliare di tabacco**

L'osservazione al microscopio a fluorescenza ed elettronico del tessuto fogliare di piante transgeniche mediante anticorpo anti-ApoA-I, non ha permesso di stabilire in via definitiva, la localizzazione cellulare della proteina mutante. L'analisi Western effettuata sulle proteine totali isolate da alcune piante AM, esprimenti il mutante amiloidogenico, ha evidenziato la presenza di una banda a basso peso molecolare (figura 3.29). L'altezza della banda è stata stimata intorno ai 12 kDa, e quindi, potrebbe essere il frammento amiloide di 93 residui aminoacidici per il quale è stato calcolato un peso molecolare pari a 11 kDa. Per valutare la presenza della fibrillogenasi in tabacco, associata all'espressione del frammento amiloide, alcune sezioni di tessuto fogliare transgenico (1100nm) sono state colorate con il blu di toluidina. Come mostrato in figura 3.30, non sono state evidenziate differenze rispetto al controllo in nessuna delle sezioni osservate e la presenza del mutante amiloide non sembra alterare la morfologia cellulare della pianta trasformata. Una ulteriore analisi è stata fatta mediante il colorante rosso Congo che lega in modo specifico le fibrille. Come mostrato in foto (figura 3.31), al microscopio a fluorescenza non sono state osservate differenze rispetto al tessuto prelevato da pianta non trasformata.

### **3.13 Localizzazione della LCAT espressa in tabacco**

Come riportato in foto (figura 3.32) la presenza dell'enzima ricombinante non risulta interferire con la morfologia cellulare che non presenta alterazioni rispetto alla pianta non trasformata. L'analisi immuno-istochimica ha mostrato la presenza di segnali dovuti a legame aspecifico dell'anticorpo usato, pertanto, l'osservazione delle sezioni di piante esprimenti la LCAT al microscopio a fluorescenza ed elettronico (figura 3.33 e 3.34) non ha permesso di stabilire in via definitiva in quale compartimento cellulare l'enzima si accumuli.

### **3.14 Espressione e localizzazione cellulare della zeolina, espressa in semi di mais**

Dalle foto (figura 3.35), risulta evidente che la zeolina non è presente ai margini dei corpi proteici e tende ad accumularsi all'interno, apparentemente in associazione con l'alfa-zeina. Nell'endosperma dei semi esprimenti la zeolina, i corpi proteici presentano fenotipo alterato (figura 3.36) rispetto a quelli osservati nell'endosperma dei semi del controllo negativo. I corpi proteici appaiono con forma non tondeggiante, dimensioni inferiori ed in numero maggiore rispetto a quelli presenti nell'endosperma del controllo negativo. L'eterogeneità nella forma dei corpi proteici sembra aumentare con lo sviluppo del tessuto, poiché nel subaleurone le differenze rispetto al controllo risultano minori (figura 3.36 c,d).

### 3.15 Espressione e localizzazione delle zeine nei semi transgenici per la zeolina

Per verificare se la presenza della zeolina modifica l'espressione e la localizzazione delle zeine, sono state effettuate analisi Western sulle proteine totali solubili estratte dall'endosperma di semi esprimanti (z+) e non esprimanti (z-) la zeolina, mediante l'ausilio di anticorpi diretti contro la alfa-, la beta- e la gamma-zeina. Tali analisi hanno evidenziato che la quantità di 22kDa alfa-zeina espressa nei semi z+ non risulta alterata dalla presenza della zeolina (figura 3.37a). L'analisi immuno-citochimica, inoltre, non ha evidenziato alterazioni nella localizzazione dell'alfa-zeina entro i corpi proteici dell'endosperma z+. Come riportato in figura 3.37b, l'analisi Western mediante l'anti 27 kDa gamma-zeina, ha mostrato nei semi z+, una riduzione della proteina. L'immuno-localizzazione della gamma-zeina nei tessuti z+ e z-, ha evidenziato la presenza della proteina non solo lungo la regione periferica dei corpi proteici, come osservato nei tessuti z-, ma anche all'interno (figura 3.38). Infine, la quantità della 15 kDa beta-zeina (figura 3.37c) espressa nei semi z+ è risultata inferiore rispetto a quella presente nei semi z-. Non sono state, invece, evidenziate differenze significative nella distribuzione della beta-zeina entro i corpi proteici dei semi z+.

### 3.16 Espressione della *Corn Legumin 1 (CL-1)*, della *Corn Alfa Globulin (CAG)* e della *Binding Protein (BiP)* nei semi transgenici per la zeolina

L'analisi western effettuata per saggiare l'espressione di alcune globuline e della BiP, nei semi z+, ha mostrato che la presenza della zeolina sembra interferire con l'espressione di tali proteine. Come riportato in figura 3.39, l'espressione della CL-1 e della CAG è risultata maggiore rispetto a quella osservata nei semi z-. Anche il livello di espressione della BiP risulta essere maggiore che nei semi *wild type*.



## 4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro ha riguardato l'espressione in tabacco del gene umano apoA-I, codificante l'apolipoproteina A-I (ApoA-I), del suo frammento amiloide apoA-I/93, codificante i primi 93 aminoacidi N-terminali, del suo mutante naturale apoA-I (L174S) e del gene codificante per l'enzima lecitina colesterolo aciltrasferasi (LCAT). Infine sono stati eseguiti esperimenti volti alla caratterizzazione di semi di mais esprimenti la proteina chimerica zeolina. Tale lavoro è stato effettuato presso il Dipartimento di Biotecnologie Molecolari dell'università di Aachen dove è stato svolto parte del lavoro di tesi.

Ad oggi non sono presenti in letteratura lavori riguardanti l'espressione di apolipoproteine umane in pianta. L'ApoA-I ricombinante, è già stata espressa in diversi sistemi eterologhi quali *E. coli* (Isacchi *et al.*, 1989; Moguilewsky, 1987), cellule d'insetto infettate con *Baculovirus* (Sorci-Thomas *et al.*, 1996) e cellule dell'ovario di *Cricetus griseus* (Malloty *et al.*, 1987). Contrariamente a quanto riportato per la ApoA-I, il peptide da 93 aminoacidi e la variante L174S non sono stati prodotti in pianta né in altri sistemi biologici. Come precedentemente riportato, mutazioni a carico del gene apoA-I conferiscono alla proteina la capacità di fibrillare a seguito di tagli proteolitici, e di rilasciare una sequenza aminoacidica aminoterminale compresa tra i 90 ed i 100 amminoacidi; il frammento generato presenta spiccata attività amiloidogenica. In natura sequenze nucleotidiche codificanti per questi frammenti amiloidogenici non sono stati identificati né come unità geniche né come prodotti di *splicing* post-trascrizionale. Tali frammenti sono, infatti, generati da un taglio proteolitico dovuto ad una mutazione della sequenza aminoacidica del gene *apoA-I*. Negli anni passati, in Italia, sono stati identificati alcuni pazienti affetti da un'amiloidosi di tipo cardiaco. Una serie di esami genetici e biochimici hanno dimostrato che tale amiloidosi, è associata ad una mutazione missenso del gene apoA-I che dà origine alla variante apoA-I(L174S). Tale mutazione comporta un taglio proteolitico nella regione amino-terminale a livello del residuo aminoacidico 93 della proteina, generando il citato frammento amiloidogenico apoA-I/93. Questo peptide, infatti, è il maggiore componente nei depositi di fibrille amiloidi in questa forma di amiloidosi (Obici *et al.*, 1999). Le condizioni strutturali in cui questo taglio proteolitico avviene ed il tipo di proteasi coinvolte non sono note. In alcuni studi è stato ipotizzato che il formare fibrille sia una capacità intrinseca di tutte le proteine, anche quelle non associate a patologie (Chiti *et al.*, 1999). Pertanto la produzione di apoA-I ricombinante identica alla forma *wild type* ed alla variante amiloidogenica in elevate quantità consentirebbe di verificare, mediante tecniche di proteolisi limitata, se vi è una diversa suscettibilità alle proteasi da parte della variante patologica e se il taglio proteolitico avviene preferenzialmente quando la proteina è libera o quando è complessata ai lipidi (Fang *et al.*, 2003).

La disponibilità di un sistema di produzione in forma ricombinante dei peptidi aprirebbe la strada a numerosi studi di tipo strutturale e funzionale attualmente resi difficili dal fatto che il reperimento di tale materiale è possibile solo da un unico cuore prelevato ad un paziente deceduto affetto da amiloidosi. Attualmente in letteratura sono riportati pochi lavori inerenti l'espressione di proteine con potenziale amiloidogenico in pianta. Il primo riguarda l'espressione, in *Solanum tuberosum* di un peptide umano  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ 42) derivante dal precursore APP695, coinvolto nella genesi della malattia di Alzheimer. La pianta transgenica funge da bioreattore per la produzione di un peptide che successivamente potrebbe essere utilizzato per ottenere un vaccino contro l'Alzheimer (Hyung-Soon *et al.*, 2003). E' stato dimostrato

infatti che gli anticorpi prodotti da cavie immunizzate con tale peptide riducono significativamente la formazione di depositi amiloidi (Shenk *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000). In un lavoro successivo Szabo *et al.* (2004) hanno espresso i peptidi A $\beta$ (1–40) e (1–42), legati alla GFP, in *Capsicum annum* var. *angulosum* (peperone verde) mediante vettori virali. I peperoni transgenici sono stati poi saggiati per valutarne la capacità di produrre anticorpi contro gli A $\beta$  peptidi mediante immunizzazione orale. In un diverso lavoro *S. tuberosum* è stato utilizzato come bioreattore per la produzione di lattoferrina umana (Nilsson e Dobson, 2003). Tale proteina rientra nella classificazione di polipeptidi associati alla genesi di amiloidosi (Ando *et al.*, 2002). Nel lavoro citato la lattoferrina è stata prodotta in patata per i suoi potenziali terapeutici in funzione delle sue proprietà antibiotiche, trascurandone le caratteristiche amiloidogeniche (Nilsson e Dobson, 2003).

I lavori riguardanti l'espressione del frammento amiloidogenico *apoA-I/93*, in un sistema eterologo, hanno invece evidenziato enormi difficoltà ed ogni tentativo ha rappresentato un fallimento a causa dell'elevata instabilità del frammento (Andreola *et al.*, 2003). Il peptide *apoA-I/93* risulta, infatti, parzialmente destrutturato e flessibile e per questo facilmente aggredibile dalle proteasi endo- o esocellulari.

In alcuni esperimenti, condotti presso il laboratorio della Prof.ssa Piccoli (Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università di Napoli Federico II; comunicazione personale) hanno tentato di esprimere il peptide *apoA-I/93* in *E. coli* ed in cellule eucariotiche CHO-K1, mediante l'utilizzo di diverse strategie. Le strategie usate hanno permesso di ottenere organismi transgenici nei quali è stato possibile rilevare la presenza della sequenza trasferita *apoA-I/93* ed il relativo trascritto ma non il peptide ricombinante. L'assenza del peptide amiloidogenico è probabilmente da correlare ad eventi successivi alla trascrizione durante i quali il prodotto subisce degradazione proteolitica (Andreola *et al.*, 2003). Questo potrebbe spiegare l'assenza del peptide ricombinante sia in cellule procariotiche sia eucariotiche.

Attualmente si è riusciti ad ottenere in *E. coli* il frammento *apoA-I/93* come proteina di fusione con la glutatione S-trasferasi (GST) (Piccoli *et al.*, comunicazione personale). In tale lavoro il peptide *apoA-I/93* presenta però 9 amminoacidi in più al suo estremo N-terminale rispetto al peptide amiloidogenico naturale.

L'interesse per le proteine amiloidi, non è, però, limitato al solo aspetto patologico. Altre applicazioni biotecnologiche di alcune proteine amiloidi si basano, infatti, sulle caratteristiche chimico-fisiche e sulla capacità di formare fibrille altamente strutturate. Questo potenziale, negativo se considerato in un'ottica clinica, rappresenta, con crescente interesse, l'opportunità di un impiego di tipo nanobiotecnologico (Donald, 2005). I polipeptidi con caratteristiche amiloidogeniche, infatti, hanno la capacità di autoassemblarsi e autostrutturarsi in complessi macromolecolari ben ordinati: tale capacità li rende possibili candidati per la costruzione di materiale nanofibrillare. Essi, infatti, possono essere usati come *template* per la sintesi di nanofibrille, materiale che trova sempre maggiori applicazioni soprattutto nella costruzione dei *nanowires*, o "nanoconduttori" (Donald, 2005; Daizo Hamada *et al.*, 2004). Le applicazioni più promettenti dei *nanowires* sono nel campo dei semiconduttori, per la futura costruzione di *microchip*, ma vi sono anche altre possibili estensioni in applicazioni meccaniche ed elettroniche. La sintesi di tali nanoconduttori viene fino ad ora effettuata utilizzando due strategie opposte (Daizo Hamada *et al.*, 2004). La prima, molto costosa e laboriosa, prevede la compressione di materiale macroscopico fino al raggiungimento di dimensione nanometriche (*top-down strategy*), l'altra strategia (*bottom-up strategy*), in crescente sviluppo, utilizza biomolecole, quali proteine con potenziale amiloidogenico, capaci di autoassemblarsi in nanofibrille ben organizzate.

Attualmente, sono già numerosi i lavori in cui si è dimostrato l'uso dei  $\beta$ -sheets fibrillari come *scaffolds* in diversi campi. Alcuni usi sono ad esempio la promozione dell'adesione cellulare e la crescita di tessuti ingegnerizzati (Zhang *et al.* 1995); per l'adesione di linee cellulari di mammifero; per la promozione dell'adesione di cellule neuronali; per la promozione della sintesi di matrice extracellulare. Altri possibili usi possono essere i *Metal Nanowires Conducting* basati sul *self-assembly* amiloidogenico controllato.

Un esempio di tale uso è riportato nel lavoro di Scheibel *et al.* (2004). Nel lavoro citato, le regioni N-terminale e la Middle detta "NM" del lievito *S. cerevisiae* Sup35p, sono utilizzate per produrre proteine fibrillari con diametro di 10 nm molto stabili. In un processo multi-step le particelle di Au sono coniugate ai residui di cisteina ingegnerizzati presenti nella proteina del lievito Sup35p formante le fibrille, e successivamente si ha la deposizione di Ag e Au nelle fibrille modificate. Le fibre NM modificate presentano una struttura altamente flessibile e solubile che si converte rapidamente a formare fibrille amiloidogeniche quando è associata con fibre pre-formate. Una volta formate le fibre presentano una resistenza molto alta a trattamenti con proteasi e denaturanti proteici e grazie alla loro stabilità possono sopportare le procedure di metallizzazione necessarie per la creazione di circuiti elettrici.

In un altro lavoro Reches *et al.* (2003) hanno ottenuto, mediante *self-assembly* del peptide difenil-alanina  $\beta$ -amiloide dell'Alzheimer (L-Phe-L-Phe), nanotubi rigidi. Successivamente si aveva la deposizione di nanoparticelle all'interno dei tubi, riduzione degli ioni di Ag e successiva rimozione del peptide mediante degradazione enzimatica. Quindi, in questo caso, si ottengono nanotubi peptidici a partire da dipeptidi. Ciò dimostra che il breve motivo centrale del polipeptide  $\beta$ -amiloide contiene tutte le informazioni necessarie per mediare il *self-assembly* in strutture regolari. Una ulteriore possibilità di utilizzo delle fibrille, sono gli idro-gel, in cui si ha la coniugazione di sequenze peptidiche specifiche per formare polimeri sintetici. Questi possono avere applicazioni biomediche in quanto gli idrogel sono usati come materiali biocompatibili e/o biodegradabili con condizioni fisiche controllabili. Schneider *et al.* (2004) hanno, ad esempio, preparato *scaffold* di idrogel con risposta chimica e meccanica, basati sull'uso di un peptide sintetico che, in seguito al *folding* intramolecolare, si organizza in un  $\beta$ -sheets in risposta al pH. L'evento di *folding* promuove le interazioni molecolari (*self-assembly*) che consentono al gel di rispondere a vari stress e contemporaneamente l'idrogel può essere dissolto semplicemente alterando il pH.

Attualmente l'utilizzo di molecole biologiche per produrre dispositivi su scala nanometrica rappresenta un approccio molto promettente, ed i risultati ottenuti da Reches e Scheibel, supportano l'efficacia di tale tecnica nella costruzione dei *nanowires*.

Anche per l'enzima umano LCAT che, attivato dalla ApoA-I, esterifica il colesterolo permettendone la rapida rimozione dai tessuti ed il trasporto al fegato, ad oggi non sono noti lavori riguardanti una sua espressione in pianta. La LCAT umana è stata però già espressa in tre diversi sistemi cellulari: CHO, BHK ed in cellule di insetto. L'enzima espresso in cellule CHO (Miller *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 1997; Chisholm *et al.*, 1999) e cellule BHK (Hill *et al.*, 1993) è risultato estremamente simile a quello umano ma un'analisi più approfondita ha evidenziato la presenza di catene glicosidiche più complesse ed eterogenee rispetto all'enzima espresso nel sistema omologo. La LCAT espressa in cellule di insetto, invece, è risultata enzimaticamente attiva ma risulta ipo-glicosilata con catene glicosidiche più corte rispetto all'enzima espresso nel sistema omologo (Miller *et al.*, 1996, Chawla e Owen 1995).

Il primo passo del lavoro di tesi è stato quello di individuare la presenza, in pianta, di proteine omologhe per struttura e funzione all'apolipoproteina, mediante un'analisi *in silico*. I risultati dell'allineamento della sequenza aminoacidica di ApoA-I nella banca dati *Viridiplante*, hanno evidenziato la presenza di 5 polipeptidi vegetali che presentano una percentuale di identità aminoacidica compresa tra il 20% ed il 26%. La sequenza aminoacidica in comune corrisponde ad una struttura di tipo  $\alpha$ -elica che lascerebbe pensare ad una omologia funzionale tra le sequenze, benché secondo quanto riportato da Tramontano *et al.* (2001) è stato dimostrato che due regioni possono essere definite omologhe solo se hanno un'identità di sequenza aminoacidica superiore al 30%. Nel nostro caso il valore di identità aminoacidica ottenuto per i polipeptidi vegetali allineati è risultato molto più basso. Inoltre tra i polipeptidi allineati sono presenti una proteina putativamente coinvolta nella risposta a stress (Q6ZBK6) ed una DNA repair protein (Q7Y239) di *Oryza sativa* ed una proteina strutturale della matrice nucleare (Q9FLH0) di *Arabidopsis thaliana*. Tali polipeptidi presentano funzioni diverse rispetto alla ApoA-I, pertanto possiamo escludere la presenza, in pianta, di polipeptidi omologhi per funzione alla ApoA-I umana.

La localizzazione cellulare o extracellulare del polipeptide ricombinante è di fondamentale importanza, per consentire il mantenimento della giusta conformazione strutturale. Ad esempio in un ambiente acquoso, con un pH neutrale e l'interazione del polipeptide amiloidogenico con i fosfolipidi potrebbe prevenire la transizione conformazionale di apoA-I/93 dalla normale struttura di  $\alpha$ -elica alla struttura dei  $\beta$ -sheets formanti le fibrille, evitandone la formazione (Andreola *et al.*, 2003). A tal proposito, l'analisi *in silico* effettuata per predire la localizzazione cellulare in pianta dell'ApoA-I con e senza il prepropeptide, ha evidenziato che il pre-peptide segnale dovrebbe essere riconosciuto anche in pianta e veicolerebbe la proteina in ambiente extracellulare, mentre il pro-peptide di 6 residui aminoacidici potrebbe non essere riconosciuto. L'ApoA-I sprovvista del prepropeptide rimarrebbe, invece, in ambiente citoplasmatico.

La proteina espressa nel sistema omologo non presenta glicosilazioni e le sole modificazioni post-traduzionali riportate consistono in acilazioni e fosforilazioni (Beg *et al.*, 1989; Hoeg *et al.*, 1986). L'analisi *in silico* ha evidenziato che in pianta tali modificazioni post-traduzionali non dovrebbero essere effettuate. Nel caso la previsione fosse corretta, l'assenza di tali modifiche non dovrebbe alterare la qualità del prodotto finale. Schimdt *et al.* (1997) effettuarono studi di cinetica e saggi *in vivo* per valutare la capacità di associazione tra la ApoA-I ricombinante (espressa in *E. coli*) e le HDL di coniglio e umane. L'assenza di alterazioni dimostrò che la ApoA-I risulta strutturalmente invariata e funzionalmente attiva anche in assenza di modifiche post-traduzionali.

Anche la sequenza aminoacidica della LCAT umana è stata allineata con le sequenze aminoacidiche dei polipeptidi vegetali presenti nella banca dati "*Viridiplante*". Tale esame, finalizzato alla ricerca in pianta di proteine omologhe per struttura e funzione alla LCAT umana che avrebbero potuto avere eventuali influenze dell'espressione del gene eterologo sulle vie metaboliche dell'organismo ospite, ha evidenziato l'esistenza di proteine classificate come LCAT-like. Tali proteine mostrano un'identità aminoacidica superiore al 30% ed i valori di *score* ed *e-value* ottenuti hanno mostrato un'alta identità di sequenza, di struttura e di funzione. Le LCAT-like presenti in pianta sembrano catalizzare la medesima reazione di transesterificazione propria dell'enzima umano. La LCAT umana e, più in generale, quella animale è di fondamentale importanza nel trasporto del colesterolo nel plasma. Recenti studi hanno invece suggerito in pianta un ruolo differente, come la

regolazione del contenuto lipidico. Con molta probabilità ci troviamo dinanzi ad un caso di divergenza evoluzionistica in cui un gene ancestrale precursore ha dato luogo ad un prodotto che pur mantenendo strettamente la sua funzione si è inserito, nel corso di milioni di anni di evoluzione, in diversi contesti biologici interagendo in vie biosintetiche differenti: nei mammiferi la LCAT interagisce con i complessi lipoproteici delle HDL, in pianta la si ritrova nei tonoplasti e nei cloroplasti (Noiriel *et al.*, 2004) e con molta probabilità è coinvolta nella regolazione del contenuto lipidico, e dunque, della fluidità della membrana.

Esaminando la sequenza nucleotidica codificante l'ApoA-I e la LCAT umana è stata rilevata la presenza di alcuni codoni poco rappresentati in tabacco. Tale differenza potrebbe influire negativamente sui livelli di espressione del transgene (Duret e Mouchiroud, 1999). Questo limite potrebbe essere superato con la tecnica che prevede la sostituzione delle triplette meno rappresentate con quelle più frequenti nel sistema eterologo. Questo approccio è già stato utilizzato con successo per l'espressione di ApoA-I in *E. coli* (Ryan *et al.*, 2002). Studi recenti hanno però suggerito che sostituire una triplette meno rappresentata con una più frequente nel sistema eterologo non sempre permette di incrementare l'espressione della proteina ricombinante. L'inserimento di codoni diversi in punti inappropriati potrebbe destabilizzare l'mRNA, o lo stesso DNA, e quindi diminuire l'espressione della proteina ricombinante (Gutman e Hatfield, 1989; Hatfield e Gutman, 1993; Hatfield e Roth, 2007; Irwin *et al.*, 1995; Kittle, 2006; Cortazzo *et al.*, 2002; Chava Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2006).

Le sequenze geniche ed i cDNA dei geni in esame utilizzati per la costruzione dei vettori con cui è stata condotta la trasformazione di *N. tabacum*, sono stati posti sotto il controllo del promotore del gene 35S del CaMV (Topfer *et al.*, 1987). L'utilizzo di questo promotore, che induce in pianta un'espressione genica costitutiva superiore rispetto ad altri promotori, permette una produzione di proteine ricombinanti compresa tra lo 0,02% ed lo 0,1% delle proteine totali solubili (Giddings *et al.*, 2000). Attualmente, tali rese non sono considerate ottimali per la produzione su scala industriale (Giddings *et al.*, 2000), benché in alcuni casi ciò può essere sufficiente. Un esempio significativo, può essere la proteina C umana (Cramer *et al.*, 1996), che possedendo un alto valore aggiunto, nonostante sia espressa in bassa quantità, viene già commercializzata da tempo. Una strategia che permetterebbe di superare il problema della bassa resa potrebbe essere quello dell'iperaccumulo tessuto specifico come, ad esempio, nei semi. Una strategia del genere ha permesso ad esempio di esprimere le encefaline in quantità pari al 2,6% del TSP (Vandekerckhove *et al.*, 1989). Un'altra possibilità è, ad esempio, quella di associare la produzione della molecola d'interesse in una pianta di interesse industriale, come nel caso della produzione di albumina di siero umano in amido di patata. Tale espressione è associata alla contemporanea produzione di amido stesso che ne ammortizza i costi (Sijmons *et al.*, 1990).

#### **4.1 Espressione della ApoA-I umana in piante e colture cellulari di tabacco**

In seguito al lavoro svolto sono stati ottenuti cloni di *N. tabacum* cv Samsun NN, trasformati per il gene apoA-I. L'analisi molecolare condotta mediante amplificazione del DNA sui cloni di tabacco transgenici ha dimostrato l'inserimento del gene d'interesse nel genoma di tabacco ma in non tutti i cloni radicati su substrato selettivo. La mancata amplificazione in tali cloni suggerisce che essi siano da

considerarsi *escape* (Horsch *et al.*, 1985; Klee *et al.*, 1987): alcune gemme potrebbero provenire da tessuti chimerici e quindi i germogli da essi derivati potrebbero presentare una parziale resistenza all'antibiotico oppure essersi originate da cellule non transgeniche che sono riuscite a sopravvivere in presenza dell'antibiotico in quanto quest'ultimo verrebbe degradato dalle cellule transgeniche che attorniano le prime per il fenomeno noto come *cross-feeding* (Lurquin e Filippone, 1989).

Il profilo d'espressione dell'RNA conferma che il transgene è correttamente trascritto e le bande prodotte in seguito all'analisi Western delle 7 piantine esprimenti ApoA-I hanno mostrato un peso molecolare pari a circa 25 kDa identico a quello osservato per la proteina ApoA-I umana usata come controllo positivo. L'analisi di segregazione ha evidenziato la presenza di piante in cui sembra essersi integrata una o due, copie del transgene. Tale analisi è stata necessaria perchè è importante isolare linee transgeniche con basso o, meglio, singolo numero di copie del transgene, dato che tale fattore incide fortemente sulla stabilità dell'espressione della proteina ricombinante (Jones, 2005). Un numero di copie del transgene superiore a due può, ad esempio, causare silenziamento dell'espressione del transgene (Matzke e Matzke, 1998). In altri casi, anche in assenza di silenziamento nei trasformanti primari, l'espressione del transgene potrebbe risultare silenziata nelle generazioni successive (Kilby *et al.*, 1992; Neuhuber *et al.*, 1994; Kumpatla e Hall, 1998). Inoltre si potrebbe avere ricombinazione tra geni in multipla copia con conseguente riarrangiamento del transgene. La presenza di copie multiple del transgene può determinare una segregazione Mendeliana di tipo di-genico o multi-genico (Cluster *et al.* 1996). In alcuni studi è stata però osservata una segregazione non-Mendeliana (Limanton-Grevet e Jullien, 2001; Yin *et al.*, 2004; Kohli *et al.*, 2003; Sparks and Jones, 2004). Le analisi effettuate sulle piante T<sub>1</sub> hanno evidenziato un'espressione della ApoA-I ricombinante stabile e livelli di espressione in tessuto fogliare compresi tra lo 0,01 e lo 0,04% del TSP. Tali valori sono risultati simili a quelli osservati per le piante T<sub>0</sub>, ma per una pianta derivata dalla linea Ap15 e per tre piante derivate dalla linea Ap18, entrambe recanti singola copia del transgene, sono stati osservati livelli intorno allo 0,1%. Tali differenze sono probabilmente ascrivibili ad un effetto dose. Per incrementare l'espressione, infatti, è possibile, ed è preferibile, incrociare, o autofecondare, linee transgeniche stabili recanti una singola copia del transgene per ottenere degli individui omozigoti (Zhong *et al.*, 1999), piuttosto che isolare linee transgeniche con elevato numero di copie del transgene ed elevati livelli d'espressione. Questo approccio riduce il rischio di silenziamento genico, dovuto a inserzioni geniche multiple. L'identificazione di linee transgeniche stabili e recanti una singola copia del transgene è essenziale anche per fini industriali, in tal modo si può essere sicuri che il transgene è trasmesso attraverso le generazioni successive secondo schemi noti e prevedibili. Per tali ragioni molti studi recenti, per diverse specie, sono appunto volti allo sviluppo di tecniche che permettano di incrementare il numero di cloni transgenici a basso numero di copie ottenibili da ciascun evento di trasformazione (Qin Yao *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2000; Loc *et al.*, 2002; Romano *et al.*, 2003; Agrawal *et al.*, 2005).

La ApoA-I espressa in tabacco, in assenza di segnali peptidici per l'indirizzamento a qualche compartimento cellulare, come evidenziato dalle analisi *in silico*, dovrebbe accumularsi nel citoplasma. L'osservazione al microscopio a fluorescenza di sezioni di tessuto fogliare ha permesso di confermare quanto previsto. Il segnale della ApoA-I è stato, infatti, evidenziato nel citoplasma. Le osservazioni al microscopio elettronico hanno dato un'ulteriore conferma ma hanno anche mostrato presenza della ApoA-I ricombinante nei vacuoli e nell'apoplasto, mostrando, quindi, la parziale

secrezione della proteina ricombinante. Le proteine secrete, quelle indirizzate ai vacuoli, al reticolo endoplasmatico (ER) ed al Golgi, richiedono sequenze specifiche. Alcuni esperimenti hanno infatti dimostrato che la semplice addizione di un peptide *leader* N-terminale a proteine citosoliche è sufficiente per indirizzarle al lume del ER (Dore *et al.*, 1989; Iturriaga *et al.*, 1989). Successivamente è stato sviluppato il concetto di *pathway* secretorio di *default*, predefinito (Denecke *et al.*, 1990; De Loose *et al.*, 1991). Tale modello era supportato dalla scoperta che la sovra-espressione di proteine vacuolari ne determina la parziale secrezione (Stevens *et al.*, 1986), probabilmente a causa di una saturazione dei recettori responsabili per il trasporto vacuolare. Studi più approfonditi hanno poi suggerito che, nelle cellule vegetali, in assenza di qualsiasi segnale le proteine possano essere secrete mediante tale meccanismo. La parziale secrezione della ApoA-I ricombinante è confermata anche dalle analisi condotte sulle proteine totali secrete da colture cellulari.

Dopo aver isolato le linee transgeniche stabili, da queste sono state ottenute delle colture cellulari in coltura liquida. Le colture cellulari sono state già da tempo usate per produrre proteine ricombinanti di interesse medico e ad oggi, sono numerosi i successi ottenuti, in particolare con cellule di tabacco, quali la sintesi di albumina da siero umano (Sijmons *et al.*, 1990), anticorpi (Firek *et al.*, 1993; Magnuson *et al.*, 1996, Fischer R *et al.*, 1999a, LaCount W *et al.*, 1997, Fischer R *et al.*, 1999b, Ramirez N *et al.*, 2000), l'eritropoietina umana (Matsumoto S *et al.* 1995, Matsumoto S *et al.* 1993), la briodina 1 (Francisco JA *et al.*, 1997), le interleuchine (Kwon TH *et al.* 2003, Magnuson NS *et al.*, 1998), la ricina (Sehnke PC e Ferl RJ 1999), fattori di crescita (James *et al.*, 2000; Lee SY e Kim, 2002). Le più note ed utilizzate sono le colture cellulari ottenute dalle cultivar di tabacco *Bright Yellow 2* (BY-2) e da *Nicotina tabacum* 1 (NT-1), ma, come da noi fatto, possono essere ottenute anche partendo da piante di tabacco transgeniche. Un fattore limitante per la produzione delle proteine mediante le colture cellulari, rispetto alle piante, è rappresentato dalle basse rese. Ciò è dovuto, da un lato, allo stato cellulare indifferenziato della coltura cellulare e, dall'altro, alla mancanza di promotori davvero efficienti in tali condizioni. Un altro problema è dato dalla degradazione delle proteine nel mezzo di coltura a causa della proteolisi, dell'aggregazione ed altri fattori non del tutto noti (Kwon TH *et al.* 2003, LaCount W *et al.*, 1997, Lee SY *et al.*, 2002).

Un esempio di aggregazione, lo osserviamo anche con l'ApoA-I, infatti, l'analisi Western effettuata sulle proteine totali secrete nel mezzo di coltura, evidenzia un peso molecolare maggiore rispetto alla proteina purificata, stimato intorno ai 74 kDa. Sono state individuati diversi stati conformazionali della ApoA-I, ognuno dei quali è associato con uno stato ben definito: *lipid-bound*, *lipid poor* e *lipid-free*. In assenza di lipidi, è noto che la proteina tende a formare dimeri o trimeri, per stabilizzarsi ed acquisisce una struttura caratterizzata da un gruppo di 4 alfa-eliche N-terminali e altre 2 C-terminali (Abdul Ajees *et al.*, 2006). È probabile che ciò accada quando la proteina viene concentrata, durante le fasi di precipitazione delle proteine totali mediante *salting-out*. Infatti, a bassa concentrazione, oppure in presenza di guanidina idrocloride, è possibile osservare solo la forma monomerica (Vitello e Scanu, 1976; Edelstein e Scanu, 1980; Philippe G. Frank e Yves L. Marcel, 2000).

I livelli di espressione delle proteine ricombinanti nelle colture cellulari sono comunque un fattore estremamente variabile, con quantità di prodotto variabile dallo 0,0064% al 4% del TSP. La quantità di prodotto ricombinante potrebbe, comunque, essere incrementata aggiungendo composti inorganici (Wongsamuth e Doran, 1997), aminoacidi (Fischer *et al.*, 1999), agenti stabilizzanti come il dimetilsulfonide (Wahl *et al.*, 1995), il PEG (Kwon TH *et al.* 2003, Lee SY *et al.*, 2002), il PVP (Kwon TH *et al.* 2003, Sharp JM e Doran PM, 2001, Lee SY *et al.*, 2002, Wongsamuth e Doran,

1997, Magnuson *et al.*, 1996), la gelatina (Kwon TH *et al.* 2003, Lee SY *et al.*, 2002, Wongsamuth e Doran, 1997), e la BSA (James *et al.*, 2000). Le colture cellulari, però, hanno vantaggi notevoli quali la bassa quantità di proteine endogene secrete nel mezzo liquido, che quindi faciliterebbe i passaggi di recupero e purificazione della ApoA-I ricombinante.

## 4.2 Espressione del peptide ApoA-I/93 e del mutante naturale ApoA-I (L174S) in tabacco

Viste le difficoltà incontrate nell'espressione del peptide *apoA-I/93* in sistemi eterologhi, si è deciso di provare una strategia alternativa. Oltre a costruire un vettore per l'espressione del peptide amiloide, abbiamo deciso di esprimere in tabacco anche il gene umano *apoA-I(L174S)* codificante il mutante naturale dell'apolipoproteina A-I che genera il peptide amiloide da 93 aminoacidi.

L'analisi molecolare condotta sui cloni di tabacco transgenici, per entrambi i costrutti, ha dimostrato l'inserimento dei geni d'interesse nel genoma di alcuni cloni radicati su substrato selettivo. Anche in questi esperimenti è stato messo in evidenza il fenomeno dell'*escape* (Horsch *et al.*, 1985; Klee *et al.*, 1987). Il profilo d'espressione dell'RNA conferma che il transgene è correttamente trascritto ma non in tutti i cloni transgenici. Nei cloni in cui non è presente il messaggio è possibile ipotizzare un silenziamento di tipo trascrizionale (TGS, *transcriptional gene silencing*). Il TGS impedisce la sintesi dell'mRNA del gene "bersaglio" perché coinvolge interazioni tra geni che hanno omologia nelle sequenze dei promotori. Su tali sequenze, aumenta il grado di metilazione e la trascrizione viene impedita a causa dell'associazione di un complesso proteico al DNA metilato (Derek *et al.*, 2003). I risultati dell'analisi Western su tutti i cloni positivi per l'analisi di trascrizione di *apoA-I/93* suggeriscono la presenza di fenomeni di silenziamento post-trascrizionale attribuibili alle ridotte dimensioni del trascritto. Il risultato ottenuto nel presente lavoro è comunque in accordo con quanto già noto per altri sistemi biologici. Come precedentemente riportato, in letteratura sono presenti lavori riguardanti l'espressione del peptide amiloidogenico in batteri e cellule CHO (Piccoli *et al.*, comunicazione personale; Andreola *et al.*, 2003). In tali lavori è stata evidenziata la difficoltà di produrre i peptidi amiloidogenici a causa dell'elevata instabilità poiché questi risultano parzialmente destrutturati e per questo facilmente aggredibili dalle proteasi endo- o esocellulari (Andreola *et al.*, 2003).

Le bande prodotte in seguito all'analisi Western sulle proteine totali estratte dalle piantine esprimenti l'*apoA-I (L174)*, hanno, invece, mostrato un peso molecolare corrispondente a quello atteso. Non in tutte le piante in cui è stata identificata la presenza di un trascritto è stata poi evidenziata la proteina ricombinante. Tale risultato potrebbe essere ascrivito ad un silenziamento di tipo post trascrizionale. Il silenziamento è un meccanismo che si è evoluto nelle piante nel corso degli anni come difesa contro i virus e viroidi e può essere utilizzato dalle piante geneticamente trasformate per silenziare geni eterologhi, specie se questi ultimi sono rappresentati nel genoma in elevato numero di copie (Kooter *et al.*, 1999; Al-Kaff *et al.*, 2000). Sono stati individuati due meccanismi di silenziamento: il TGS, già descritto, e quello post-trascrizionale (PTGS, *post-transcriptional gene silencing*). Nel PTGS il transgene è trascritto ma l'RNA è rapidamente degradato (Yu e Kumar, 2003; Pickford e Cogoni, 2003; Susi *et al.*, 2004). Tale silenziamento può essere indotto dall'RNA a doppio filamento in cui l'mRNA del transgene può essere convertito dall'azione di una RNA polimerasi RNA-dipendente (Lindbo *et al.*, 1993; Dalmay *et*



al., 2000). Il PTGS può inoltre essere amplificato dall'accumulo di mRNA determinato dall'uso di promotori forti quale il promotore del gene 35S di CaMV (Lindbo et al., 1993; Goodwin et al., 1996; Que et al., 1997) scelto nel presente lavoro per guidare l'espressione dei polipeptidi ricombinanti in tabacco. Dall'analisi Western è stata anche evidenziata la presenza, in alcune piante, di frammenti per i quali è stato stimato un peso molecolare pari a 12 kDa. Tale peso molecolare sembra associabile agli 11 kDa attesi in caso di corretta formazione del peptide da 93 aminoacidi. Le analisi successive fatte con il microscopio a fluorescenza ed elettronico non hanno però mostrato formazione di fibrille. L'assenza delle fibrille potrebbe essere dovuta all'assenza in pianta di proteasi più o meno specifiche. In effetti, ad oggi poco è conosciuto sul processamento naturale che ne determina la formazione. Una diversa spiegazione potrebbe essere che i peptidi ricombinanti, seppur presenti, non sono in grado di auto-assemblarsi e formare le fibrille. Attualmente non ci sono molecole in grado di interferire con lo sviluppo naturale delle proteine amiloidi. In uno studio condotto nel 2006 da Porat *et al.*, hanno analizzato una serie di polifenoli che hanno mostrato di inibire fortemente la formazione delle fibrille *in vitro* e la relativa citotossicità. L'inibizione è probabilmente dovuta alle proprietà antiossidanti ed alla struttura stessa dei polifenoli. E' probabile che la presenza di notevoli quantità di polifenoli in tabacco (Li Z. *et al.*, 2003) possa interferire con la genesi delle fibrille. E' indubbio però, che sono necessarie ulteriori analisi quali il sequenziamento del frammento da 12kDa osservato per confermare la presenza del peptide amiloide nelle linee transgeniche.

### 4.3 Espressione dell'enzima umano LCAT in tabacco

La trasformazione genetica di tabacco mediato da *A. tumefaciens*, ha permesso di ottenere cloni di *N. tabacum* cv Samsun NN putativi transgenici per il gene *lcat*. Le analisi molecolari effettuate mediante amplificazione del DNA sui cloni di tabacco ha dimostrato l'inserimento del gene d'interesse nel genoma solo in 6 tra gli 11 cloni radicati sul substrato selettivo. La presenza di cloni putativi transgenici, in cui l'analisi PCR non ha mostrato la presenza del gene di interesse, mostra nuovamente il fenomeno dell'*escape* (Horsch *et al.*, 1987). L'analisi dell'espressione dell'mRNA conferma la corretta trascrizione del transgene che però non viene effettuata con la stessa intensità in tutti i cloni. L'analisi dell'espressione del transgene *lcat*, condotta su proteine totali estratte dalle piante di tabacco trasformate, ha rilevato la presenza della proteina eterologa ma con un peso molecolare inferiore, che non corrisponde al peso indicato dalla LCAT purificata da plasma umano, usata come controllo positivo. Un'ipotesi per spiegare la differenza osservata, potrebbe essere che la maturazione dell'enzima espresso in tabacco avviene correttamente, eccetto che per la glicosilazione. La glicosilazione è un processo piuttosto complesso ed è difficile stabilire con certezza se, o in che modo, la LCAT eterologa espressa nei tessuti di tabacco subisca tali modifiche post-traduzionale. Come riportato in letteratura, ed in accordo con quanto osservato nel nostro studio, la LCAT umana migra producendo una banda, leggermente slargata, di massa stimata intorno ai 65-68 kDa (Chung *et al.*, 1979; Doi e Nishida, 1981; Lima *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 2004). A seguito di trattamenti con varie endoglicosilasi su campioni proteici di LCAT purificata, tale banda si convertiva ad una banda netta corrispondente al peso molecolare di circa 47.000 Da. Il valore più accurato di 47.089 Da è stato ottenuto dopo sequenziamento del cDNA del gene e verifica dei 416 aminoacidi che costituiscono l'enzima (Mc. Lean *et al.*, 1986). La LCAT espressa in tabacco presenta un peso molecolare

stimato intorno ai 47-48 kDa associabile a quanto osservato da Mc Lea *et al.*, sembra quindi che la LCAT espressa in pianta presenti una glicosilazione parziale o addirittura assente rispetto all'enzima espresso nel sistema omologo. Nell'uomo la LCAT permanerebbe anche all'interno dei lisosomi, dove potrebbe subire le ultime modifiche della glicosilazione iniziata nell'apparato del Golgi. La mancanza di un segnale per l'indirizzamento lisosomiale in pianta potrebbe determinare il mancato passaggio della proteina nell'apparato del Golgi. Considerando la sola sequenza aminoacidica, la LCAT possiede un'idrofobicità intermedia tra una proteina di membrane e le apolipoproteine (Yang *et al.*, 1987) ed i quattro complessi N-lincati e i due complessi O-lincati (Schindler *et al.*, 1995; Lacko *et al.*, 1998) ne incrementano la solubilità e l'idrofilicità. Nel sistema omologo la LCAT subisce glicosilazioni piuttosto complesse che rappresentano il 20-25% del peso totale della proteina (Jin *et al.*, 1997; Jonas, 1998; Lima *et al.*, 2004). In molte proteine la catena glucidica può rivelarsi essenziale per il raggiungimento della opportuna conformazione tridimensionale, in altri casi i carboidrati hanno un ruolo poco determinante nel mantenimento del *folding*. Ancora, la glicosilazione può giocare un ruolo importante nella secrezione extracellulare, nel legare il substrato e nel mantenere il sito attivo nel giusto orientamento spaziale. Inoltre possono essere coinvolte nella regolazione della stessa attività enzimatica. Pertanto, l'assenza di una o più catene glicosidiche potrebbero avere effetti drammatici oppure non avere alcun effetto.

In alcuni casi modificazioni di glicoproteine enzimatiche ottenute *in vitro* mediante la rimozione dei residui più esterni, ha addirittura determinato un incremento dell'attività enzimatica (Doi e Nishida, 1983). Studi differenti hanno dimostrato che l'attività enzimatica di molte lipasi ed invertasi glicosilate può essere persa utilizzando inibitori della glicosilazione o agenti enzimatici che rimuovono la glicosilazione (Amri *et al.*, 1986); mentre in altri casi l'attività può rimanere invariata (Chu *et al.*, 1978).

Tali informazioni sono importanti dal momento che in questo lavoro la LCAT viene espressa in un sistema eterologo vegetale in cui il processo di glicosilazione delle proteine risulta differente da quello animale. Nella maggior parte dei casi le sequenze aminoacidiche per la glicosilazione nei mammiferi, vengono riconosciute allo stesso modo anche in pianta e la differenza sta nell'uso o meno di determinati tipi di zuccheri nella costruzione della catena saccaridica e nella tipologia del legame. Sulla base di tali osservazioni, appare evidente che una glicoproteina umana, espressa in pianta, possiede un'alta probabilità di presentare un *pattern* glicosidico differente rispetto alla proteina espressa nel sistema omologo. Solitamente queste differenze non sono significative, ma nel caso di proteine altamente glicosilate, come la LCAT, queste differenze non possono essere sottovalutate.

In letteratura non sono presenti dati sul ruolo potenziale delle catene saccaridiche nella secrezione, la stabilità o la funzione stessa della LCAT. Uno dei primi lavori finalizzati alla comprensione del ruolo delle catene oligosaccaridiche della LCAT, è stato fatto utilizzando diverse glicosidasi o inibitori specifici della glicosilazione (Lima *et al.*, 1988a e 1988b) sulla LCAT espressa in cellule Hep G2, una linea di coltura di epatociti (Erickson e Frielding, 1986; Lima *et al.*, 1987).

Successivamente Collet e Frielding (1991) condussero una ricerca sul ruolo dei saccaridi legati al residuo Asn, nella secrezione della LCAT. Furono usati alcuni inibitori della sintesi glicosidica su cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) stabilmente trasformate col gene della LCAT umana, come ad esempio la tunicamicina, un antibiotico che blocca la biosintesi di Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>3</sub> pirofosforil-dolicolo (Tkaez e Lampen, 1975) nella via biosintetica del dolicolo; oppure la monensina (Tartakoff, 1983; Uchida *et al.*, 1979) che agisce più in generale sul processo di collegamento degli oligosaccaridi nei legami N-glicosidici e O-glicosidici; oppure la swainsonina,

che inibisce le mannosidasi I e II. Dalle analisi effettuate, risultava che l'attività della LCAT era ridotta nelle cellule trattate con la tunicamicina (Collet e Fielding, 1991; Lima *et al.*, 1988a e 1988b) o con la monensina (Lima, 1989), mentre addirittura era incrementata di circa il 60% con la rimozione dei residui di acido sialico dopo trattamento con la neuraminidasi. Gli studi condotti da Montreuil *et al.* (1994) hanno, inoltre suggerito che i carboidrati possono incrementare l'emivita della proteina riducendone la suscettibilità all'azione degli enzimi proteolitici. Tale dato potrebbe essere molto importante per la LCAT visto che ha un'emivita nel plasma di circa 4 giorni (Glomset *et al.*, 1995; Stokke *et al.*, 1974). Le catene glicosidiche della LCAT sembrano quindi influenzarne notevolmente la secrezione e appaiono indispensabili per l'emivita della proteina nell'ambiente plasmatico. La stessa importanza non è stata evidenziata per l'attività enzimatica: infatti, la rimozione di tutti i siti determina la produzione in cellule ricombinanti di basse quantità di enzima che però conserva l'attività enzimatica (O *et al.*, 1993; Francone *et al.*, 1993). La rimozione di una determinata catena glicosidica, invece, potrebbe non comportare effetti negativi a carico dell'attività enzimatica. Diversi studi hanno infatti evidenziato che l'eliminazione, mediante mutazione sito specifica, di uno specifico sito per la glicosilazione potrebbe abbassare fortemente l'attività enzimatica (O *et al.*, 1993; Francone *et al.*, 1993) o addirittura incrementarla. Ad esempio, Kosman e Jonas (2001) hanno mutagenizzato la sequenza aminoacidica della LCAT per rimuovere uno alla volta i siti per la glicosilazione ed hanno espresso i mutanti in cellule CHO. Il mutante N84Q esprimeva un enzima ricombinante con una un'attività enzimatica ridotta dell'80% rispetto all'enzima *wild type*, attività che, però, si riduce rapidamente nel tempo. Il mutante N384Q, invece, produce una Lcat con un'attività enzimatica doppia rispetto all'enzima *wild type* e con una riduzione di attività nel tempo assai più graduale.

È chiaro, quindi, che la parte glicosaccaridica nel complesso non è del tutto essenziale per l'attività dell'enzima e modifiche del *pattern* glicosidico potrebbero migliorarne addirittura l'efficienza catalitica, mentre piccole modifiche dello scheletro glucidico riguarderebbero solo l'emivita dell'enzima nel sangue.

Un'idea potrebbe comunque, essere quella di sfruttare come ospiti specie vegetali differenti o magari piante già transgeniche per qualche gene codificante enzimi responsabili della glicosilazione in mammifero e verificare se l'espressione della proteina in qualche modo viene alterata (Gomord *et al.* 2005).

#### 4.4 Analisi fenotipica delle piante Ap, AM ed LC

I cloni di *N. tabacum* NN Samsun esprimenti la ApoA-I, il mutante ApoA-I (L174S) e la LCAT sono state confrontate con piante controllo non trasformate, per identificare eventuali mutazioni fenotipiche dovute all'introduzione del gene esogeno nel genoma di tabacco. Tale confronto è stato reso necessario dal fatto che la trasformazione genetica agrobatterio-mediata dei tessuti vegetali è condizionata dalla formazione di callo. Il callo è un tessuto in grado di proliferare indefinitamente dando origine ad una massa istologica di forma irregolare le cui cellule sono considerate le meno differenziate di tutte le cellule di una pianta. Durante la formazione dei calli possono avvenire numerosi cambiamenti a carico del numero e della struttura dei cromosomi, i quali sono alla base della variabilità somaclonale (Ammirato, 1983; Olhoft & Phillips, 1999; Kaepler *et al.*, 2000).

La variabilità somaclonale si manifesta con frequenti mutazioni fenotipiche sia di tipo qualitativo che quantitativo dovute a mutazioni della sequenza nucleotidica,

attivazione di geni normalmente non trascritti e silenziamento (Kaeppeler *et al.*, 2000). Le osservazioni morfologiche preliminari non hanno evidenziato mutazioni fenotipiche a carico delle linee transgeniche ottenute. Alcune piante Ap-T<sub>1</sub> presentano un margine fogliare “ondulato” non presente nella pianta non trasformata. Tale carattere sembra associato a livelli di espressione maggiori della ApoA-I ricombinante, essendo presente esclusivamente nelle piante Ap-T<sub>1</sub> nelle quali è stato osservato un incremento dell’espressione della proteina ricombinante. Ad oggi, però, non è stata fatta una indagine approfondita per correlare i 2 fenotipi, pertanto questa rimane, al momento, una semplice ipotesi. Per quanto concerne le piante esprimenti l’enzima ricombinante, solo una piantina LC ha mostrato una certa difficoltà di sviluppo, con formazione degli organi epigei ridotti nelle dimensioni rispetto al controllo. È ipotizzabile, ma poco probabile, anche che l’inserzione del gene *lcat*, evento del tutto casuale all’interno del genoma di tabacco, abbia in qualche maniera danneggiato qualche gene responsabile della crescita, con una sorta di *knock-out* o addirittura potrebbe essersi verificato un evento di riarrangiamento del corredo cromosomico correlato in qualche modo ad una variazione somaclonale associata allo sdifferenziamento dei tessuti nello stadio della formazione di callo (Tremblay *et al.*, 1999). Nel complesso la pianta appare, però, proporzionata rispetto al controllo. È probabile, quindi, che tale clone abbia manifestato tale fenotipo a causa di un lento e stentato acclimatemento della pianta nel passaggio *vitro-vivo* per fattori ambientali non dipendenti dalla presenza del gene esogeno.

#### 4.5 Espressione della zeolina nei semi di mais

Quest’ultima parte del lavoro di tesi, è stata svolta presso il gruppo di ricerca della Dr. Eva Stoger in collaborazione con la Dr. Elsa Arcalis (Dip.di Biotecnologie Molecolari dell’Università di Aachen – Germania). Presso il citato gruppo di ricerca, sono in corso da diversi anni, studi riguardanti l’espressione della zeolina in pianta (tabacco e mais), in collaborazione con il Prof. Alessandro Vitale (Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, Consiglio Nazionale delle Ricerche di Milano). La zeina e la faseolina sono le maggiori proteine di accumulo nei semi di *Zea mays* e *Phaseolus vulgaris*. Nel 2004, il Prof. Vitale ha dimostrato che una proteina chimerica che reca i primi 89 aminoacidi della gamma-zeina fusa alla faseolina, conserva le proprietà della zeina *wild-type* (Mainieri *et al.*, 2004). La proteina chimerica prende il nome di zeolina e, diversamente dalla faseolina *wild-type*, si accumula nelle foglie di tabacco in strutture simili a corpi proteici. Successivamente la zeolina è stata espressa in semi di mais e sono state condotte analisi per determinare la presenza di interferenze con l’espressione delle zeine endogene. L’espressione di alcune zeine risulta infatti alterata nell’endosperma dei semi esprimenti la zeolina (z+): per le gamma-zeine (16kDa e 27kDa) risulta ridotta mentre per la 15kDa beta-zeina l’espressione è maggiore. Anche l’espressione di alcune non-zeine risulta alterata, infatti, il livello delle globuline e della BIP è maggiore. Infine, controllando l’ultrastruttura, sono stati identificati due fenotipi: numero elevato di corpi proteici (PBs) e morfologia alterata. Tali effetti nell’endosperma di mais, sono già noti in letteratura. Negli ultimi anni, sono stati identificati molti mutanti naturali, e non, nei quali sono state osservate differenze significative nell’espressione delle zeine. Una riduzione variabile tra il 35 ed il 55% rispetto ai livelli delle zeine delle piante *wild-type*, è stato osservato nei mutanti *o2* (*opaque2*), *DeB30* e *fl2* oppure una riduzione del 80 al 90% nei mutanti *o5*, *o9*, *o11* e *Mc* (Hunter. *et al.*, 2002). La riduzione nella sintesi della alfa-zeina, nei mutanti *o2*, è associata a PBs piccoli e amorfi (Geetha *et*

*al.*, 1991). Una riduzione nell'espressione della gamma-zeina, come nel mutante *o15* (Dannenhoffer *et al.*, 1995), determina un numero basso di PBs, mentre la sovra-espressione della stessa sembra incrementarne il numero (Lopes *et al.*, 1995; Moro *et al.*, 1995). Per altri mutanti, quali il *floury2* (*fl2*), *Mucronate* (*Mc*), e il *Defective endosperm B30* (*DeB30*), sono associati PBs con forma irregolare (Fontes *et al.*, 1991; Coleman *et al.*, 1995 e 1997). Ad esempio, il mutante *fl2* è associato con PBs dalla forma irregolare, livelli d'espressione incrementati della BiP e modifiche nel contenuto delle zeine. Tali alterazioni sono molto simili a quelle osservate nell'endosperma dei semi esprimenti la zeolina (z+). Il mutante *fl2* è causato da una mutazione missenso, con una sostituzione alanina-valina in posizione C-terminale (nel peptide segnale) a carico del gene della 22 kDa alfa-zeina. Tale mutazione comporta un accumulo del precursore della proteina, non correttamente maturato. Una possibile spiegazione del fenotipo osservato, sembra essere che l'alfa-zeina rimane ancorata sulla superficie della membrane del ER e, quindi, sulla superficie dei PBs. Questo potrebbe interferire con le normali interazioni tra le zeine e come conseguenza con il normale sviluppo sferico dei PBs (Coleman *et al.*, 1995 e 1997), comportando un incremento dell'espressione della BiP, e di altre proteine chaperone, a causa di una risposta alla presenza di proteine non maturate correttamente (*unfolded protein response*) nelle cellule dell'endosperma (Shank *et al.*, 2001).

Il mutante *DeB30*, come il *fl2*, è caratterizzato da riduzione della sintesi delle zeine, PBs amorfi, e livelli maggiori di BiP. Tale mutante è stato correlato ad una sostituzione nel peptide segnale della 19 kDa alfa-zeina (Kim *et al.*, 2004). In questo caso, il complesso peptidasi potrebbe rimanere legato al precursore perché incapace di processarlo correttamente. La presenza del complesso, potrebbe alterare le interazioni tra le zeine, e tra ciascuna zeina e le proteine chaperone durante le fasi di traslocazione. Anche il mutante *Mc* appare molto interessante. In questi, è presente una mutazione *frame-shift* nel gene codificante la 16kDa gamma-zeina che comporta un *unfolded protein response* nelle cellule dell'endosperma (Kim *et al.*, 2006). Kim *et al.* (2002), hanno riportato esperimenti nei quali sono investigate le interazioni tra le zeine, mediante l'uso della tecnica del doppio ibrido di lievito. Gli esperimenti hanno evidenziato differenze nell'interazione tra le zeine. La distribuzione delle zeine entro i PBs non è casuale, e le interazioni zeina-zeina sembrano essere essenziali per il corretto sviluppo dei PBs (Lending and Larkins, 1989). Pertanto, alterazioni nell'espressione e nella localizzazione di una zeina potrebbe avere effetti maggiori sullo sviluppo dei PBs rispetto ad altre. Da precedenti esperimenti, appare evidente che i PBs cominciano a prendere forma partendo da un'associazione tra la beta- e le gamma-zeina che coinvolge le sequenze N-terminali della 50- e della 27-kDa gamma-zeina (Geli *et al.*, 1994; Lee, 1998). Successivamente si ha un accumulo della alfa- e della delta-zeina. Infine, la 27kDa e la 50kDa gamma-zeina rimangono confinate sulla periferia dei PBs (Lending and Larkins, 1989; Woo *et al.*, 2001), insieme con la beta- e la 16-kD gamma-zeina, mentre la alfa- e la delta-zeina sono accumulate entro i PBs. Come già accennato, la zeolina è una proteina chimerica costituita dai primi 89 aminoacidi della 27kDa gamma-zeina (compreso il peptide segnale) e la faseolina (Mainieri *et al.*, 2004). L'espressione della zeolina potrebbe indurre una riduzione dell'espressione della 27kDa e della 16kDa gamma-zeina a causa della sua sequenza N-terminale derivante dalla 27kDa gamma-zeina. Le complesse interazioni tra le zeine, viste prima, nelle quali è evidente il ruolo della 15-kD beta-zeina e della gamma-zeina nel legare e organizzare la alfa- e la delta-zeina entro i PBs, potrebbe spiegare l'aumento dell'espressione della 15-kDa beta-zeina osservato nell'endosperma dei semi z+. La quantità di beta-zeina potrebbe aumentare nel tentativo di compensare

la riduzione della gamma-zeina. Questa ipotesi appare essere supportata dalla presenza di PBs irregolari, la beta- insieme con la gamma-zeina sarebbe capace di formare i PBs ma, visto che la gamma-zeina gioca un ruolo importante nelle fasi iniziali dello sviluppo dei PBs (Geli *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1997) la sua bassa espressione nell'endosperma z+ potrebbe comportare uno sviluppo incorretto dei PBs.

Riguardo all'aumento nei livelli di espressione della BiP nell'endosperma z+, come per i mutanti *fl2*, *Mc* e *DeB30*, una possibile spiegazione è che essa rappresenta una fisiologica risposta cellulare (*stress response*) alla presenza di proteine alterate, non correttamente processate o assemblate. Tale ipotesi è supportata dalle stesse piante z+ e dai tre mutanti menzionati, nei quali differenti mutazioni, a carico di differenti zeine, comportano la stessa risposta nell'espressione della BiP (Salamini *et al.* 1985). La sola riduzione dell'espressione delle zeine non giustifica l'aumento della BiP (Boston *et al.*, 1991). Infatti, nel mutante *opaque-2* (*o2*), nel quale si ha una riduzione della 22 kDa alfa-zeina (Salamini *et al.* 1985), il livello di espressione della BiP è normale, e i PBs sono piccoli ma morfologicamente normali. Come visto in precedenza, normalmente la gamma-zeina è localizzata perifericamente rispetto alla alfa-zeina nei PBs, ma nei semi z+ la gamma-zeina risulta essere distribuita entro i PBs. Un effetto simile è stato osservato nei mutanti *Mc* e *fl2*, nei quali la distribuzione della gamma-zeina/alfa-zeina è alterata (Zhang and Boston, 1992). In tali mutanti la spiegazione potrebbe essere dovuta alla presenza di proteine non correttamente processate che disturbano la normale interazione e deposizione delle zeine nell'endosperma z+. Un'ipotesi potrebbe essere che dopo l'inizio dello sviluppo dei PBs, la zeolina potrebbe interagire essa stessa, con la alfa-zeina, interferendo con la classica interazione gamma-/alfa zeina. Questa interazione potrebbe comportare un'incapacità della gamma-zeina di spostarsi sulla periferia dei PBs. L'ipotesi sembra essere supportata dalla localizzazione della zeolina nei PBs, insieme con la alfa- e la gamma-zein. Non è chiaro come questo accada, e sono, quindi, necessari ulteriori esami per identificare le interazioni molecolari responsabili.

## 5. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di dottorato sono state ottenute per la prima volta piante transgeniche esprimenti stabilmente la apolipoproteina umana A-I (ApoA-I), l'enzima lecitina colesterolo aciltrasferasi (LCAT) e la variante amiloidogenica L174S del gene apoA-I [ApoA-I(L174S)]. Il presente lavoro rappresenta inoltre il primo che ne riporta l'espressione in pianta ed in particolare, per la variante ApoA-I(L174S), questo rappresenta il primo lavoro riguardante l'espressione in un sistema eterologo.

L'espressione della ApoA-I ricombinante in tabacco risulta stabile e non sono stati osservati prodotti tronchi. La proteina è accumulata nel citoplasma, ma anche nei vacuoli e nell'apoplasto. Sono state isolate alcune linee transgeniche che presentano l'inserzione di una singola copia del transgene che esprimono in tessuto fogliare quantità di proteina ricombinante intorno allo 0,1% delle proteine totali solubili. Da tali linee sono state ottenute cellule di tabacco in coltura liquida e le analisi Western hanno dimostrato che la proteina ricombinante è secreta nel mezzo liquido. Tale risultato è particolarmente interessante poiché la presenza della ApoA-I nel mezzo liquido potrebbe semplificare in modo significativo le successive fasi di purificazione abbassandone i costi di produzione.

Sono state inoltre identificate linee transgeniche di tabacco esprimenti l'enzima umano LCAT. Tali linee presentano l'inserzione di una o due copie del transgene ed esprimono in tessuto fogliare quantità di proteina ricombinante variabile tra lo 0,2 e lo 0,6% delle proteine totali solubili piante. La LCAT ricombinante presenta un basso peso molecolare se confrontata con l'enzima purificato da plasma umano. Tale differenza suggerisce una ridotta o assente glicosilazione che non dovrebbe alterare in modo significativo l'attività enzimatica della LCAT ricombinante.

Sono state infine isolate diverse linee transgeniche di tabacco esprimenti la variante ApoA-I(L174S). In tali linee la proteina ricombinante è espressa in quantità variabili comprese tra lo 0,01 e lo 0,05% delle proteine totali solubili. Nelle linee transgeniche sono stati osservati frammenti il cui peso molecolare è stato stimato intorno ai 12 kDa. Tale frammento potrebbe essere il peptide amiloidogenico atteso. Le analisi immuno-istochimiche non hanno evidenziato presenza di fibrille in tessuto fogliare ed ulteriori esperimenti dovrebbero essere effettuati per caratterizzare il frammento osservato.

Per quanto concerne la caratterizzazione dell'espressione della zeolina nei semi di mais. La zeolina è espressa nell'endosperma ed è co-localizzata insieme alle zeine *wild type*. I livelli di espressione e la distribuzione, nei corpi proteici, delle zeine risulta essere alterata nell'endosperma dei semi trasgenici. Anche l'espressione di alcune globuline e della *binding protein* (BiP) risulta alterata. Tali alterazione hanno comportato effetti anche sullo stesso sviluppo dei corpi proteici che sono presenti in numero maggiore ed hanno un aspetto irregolare paragonati a quelli presenti nell'endosperma dei semi non trasgenici.

## 6. TABELLE E FIGURE

**Tabella 1.1:** Dimensioni, densità, contenuto lipo-proteico, tessuto di origine e funzione fisiologica dei principali complessi lipoproteici plasmatici. VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*; IDL, *Intermediate Density Lipoprotein*; LDL, *Low Density Lipoprotein*; HDL, *High Density Lipoprotein* (Tulenko TN e Sumner AE, 2002).

	Chilomicroni	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dimensioni	1000 nm	25-90 nm	40 nm	26 nm	6-12,5 nm
Densità (g/ml)	<0,93	≈ 1,000	≈ 1,012	≈ 1,041	≈ 1,136
Proteine	1-2%	5-12%	10-12%	20-22%	55%
Trigliceridi	85-88%	50-55%	24-30%	10-15%	3-15%
Fosfolipidi	≈ 8%	18-20%	25-27%	20-28%	26-46%
Esteri di colesterolo	≈ 3%	12-15%	32-35%	37-48%	15-30%
Colesterolo	≈ 1%	8-10%	8-10%	8-10%	2-10%
Apoproteine	ApoA-I ApoA-II ApoA-IV ApoB-48 ApoC-I ApoC-II ApoC-III ApoE ApoH	ApoB-100 ApoC-I ApoC-II ApoC-III ApoE	ApoB-100 ApoC-I ApoC-II ApoC-III ApoE	ApoB-100	ApoA-I ApoA-II ApoA-IV ApoC-I ApoC-II ApoC-III ApoE ApoD
Funzione Fisiologica	Trasporto dei trigliceridi e del colesterolo assunti con l'alimentazione	Trasporto di trigliceridi e colesterolo	Trasporto del colesterolo	Trasporto del colesterolo	Trasporto inverso del colesterolo
Origine	Intestino	Intestino, fegato	Fegato	Fegato	Intestino, fegato



**Tabella 1.2:** Mutazione, organi bersaglio e origine etnica di alcune varianti del gene *apoA-I* associate con l'insorgenza dell'amiloidosi.

Mutazione	Organi bersaglio	Origine etnica	
Gly <sup>26</sup> →Arg	tessuto nervoso, reni	Stati Uniti, Inghilterra, Scandinavia	Jones <i>et al.</i> , 1990; Vigushin <i>et al.</i> , 1994
Trp <sup>50</sup> →Arg	fegato, reni	Inghilterra	Booth <i>et al.</i> , 1995
Leu <sup>60</sup> →Arg	Reni	Inghilterra	Soutar <i>et al.</i> , 1992
Delezione residui 60/71 e inserzione Val-Thr	Fegato	Spagna	Booth <i>et al.</i> , 1996
Leu <sup>64</sup> →Pro	Reni		Murphy <i>et al.</i> , 2004
Del. residui 70-72	Reni	Sud Africa	Persey <i>et al.</i> , 1998
Leu <sup>75</sup> →Pro	fegato, reni	Italia, Stati Uniti	Coriu <i>et al.</i> , 2003
Leu <sup>90</sup> →Pro	cuore, pelle	Francia	Walsh, 1999
Arg <sup>173</sup> →Pro	cuore, laringe, pelle	Stati Uniti	Hamidi <i>et al.</i> , 1999
Leu <sup>174</sup> →Ser	Cuore	Italia	Obici <i>et al.</i> , 1999
Ala <sup>175</sup> →Pro			Lachmann <i>et al.</i> , 2002
Leu <sup>178</sup> →His	cuore, laringe, pelle	Francia	de Sousa <i>et al.</i> , 2000

**Tabella 1.3:** Elenco di alcune mutazioni patogene del gene *lcat*. A cura del Centro E. Grossi Paletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli studi di Milano. FLD, *Familial LCAT Deficiency*; FED, *Fish Eye Disease*.

Mutazione	Fenotipo	
Asn <sup>5</sup> →Ile	FLD	<i>Int J Clin Lab Res</i> ; 1996, 26: 250
Pro <sup>10</sup> →Leu	FED	<i>BBRC</i> 1992, 182: 583
Thr <sup>13</sup> →Met	FLD	<i>JLR</i> ; 1998, 39: 1870
Gly <sup>33</sup> →Arg	FLD	<i>Hum Mol Genet</i> ; 1995, 4: 143
Tyr <sup>83</sup> →Stop	FLD	<i>JLR</i> ; 1993, 34: 49
Arg <sup>99</sup> →Cys	FED	<i>ATVB</i> ; 1997, 17: 1382
Thr <sup>123</sup> →Ile	FED	<i>JLR</i> ; 1996, 37: 35
Arg <sup>135</sup> →Trp	FLD	<i>JCI</i> ; 1993, 91: 677
Arg <sup>140</sup> →His	FLD	<i>Hum Genet</i> ; 1995, 96: 105
Tyr <sup>144</sup> →Cys	FED	<i>JLR</i> ; 1996, 37: 35
Tyr <sup>156</sup> →Asn	FLD	<i>JLR</i> ; 1993, 34: 49
Asn <sup>228</sup> →Lys	FLD	<i>Lancet</i> ; 1991, 338: 778
Met <sup>234</sup> →Ile	FLD	<i>JCI</i> ; 1994, 93: 321
Met <sup>252</sup> →Lys	FLD	<i>FEBS Lett</i> ; 1992, 309: 307
Del G/Frameshift Val <sup>264</sup> →Stop	FLD	<i>JLR</i> ; 1995, 36: 2329
Pro <sup>307</sup> →Ser	FLD	<i>JLR</i> 1998, 39: 1870
Gly <sup>344</sup> →Ser	FLD	<i>JLR</i> 1995, 36: 2329
Ins A/Frameshift Gln <sup>376</sup> →Thr	FLD	<i>JCI</i> 1993, 91: 677

**Tabella 2.1:** Codice e sequenza 5'→3' dei primer utilizzati per la costruzione dei vettori di espressione

Primer	
Codice	Sequenza 5'→3'
73F	tttcaagcttatggatgaaccc
351R	tgcactctagatcacacctcctcc
804R	tctagatcactgggtgttgagcttc
PfECORV	attgatatcgtaaccctactccaaaatg
Apo1F	ggatccgatgaacccccccagagc
Apo1R	agatctctgggtgttgagcttcttagtg
LCATF2	gctcctcaatgtgctcttc
LCATR2	gccattgttgaccaggttct
LCATF	ggatccttctggctcctcaatgtgctcttc
LCATR	agatctttcaggaggcgggggctc
35SF	atctccactgacgtaagggatgacgc

**Tabella 2.2:** Numero di basi amplificate e temperatura di *anniling* utilizzata per ciascuna coppia di primer usata per la costruzione dei vettori di espressione

cDNA	Coppia	Amplificato (cb)	Temperatura di <i>anniling</i>
apoA-I	73F - 351R	278	60
	73F - 804R	723	60
	35SF - 351R	500	62
	PfECORV - 351R	1100	60
	Apo1F - Apo1R	350	60
lcat	LCATF2 - LCATR2	390	55
	LCATF - LCATR	1259	55

**Tabella 3.1:** Polipeptidi vegetali, con sequenza aminoacidica simile alla ApoA-I umana, selezionati considerando un *E-value* inferiore a 0,05 e una percentuale di identità aminoacidica superiore al 20%.

Numero di accessione	Proteina	Organismo	<i>E- value</i>	Aa allineati	Similarità aa (%)	Identità aa (%)
Q6ZBK6	Putative stress related-like protein interactor	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp.</i> <i>japonica</i>	0,015	97	47	26
Q7Y239	DNA repair- recombination protein	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp.</i> <i>japonica</i>	0,019	128	50	24
A3A742	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp.</i> <i>japonica</i>	0,019	128	50	24
A2X530	Putative uncharacterized protein	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp. Indica</i>	0,025	127	50	24
Q9FLH0	Putative nuclear matrix constituent protein 1-like protein	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	0,042	145	46	20

**Tabella 3.2:** Predizione della localizzazione cellulare della *pre-pro-ApoA-I*, della ApoA-I, della Apo93 e della *pre-LCAT* ricombinanti espresse in tabacco (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>).

Proteina	Possibile localizzazione	Probabilità (%)
<i>pre-pro-ApoA-I</i>	Apoplasto	37
	Perossisoma	10,6
	Reticolo endoplasmatico (membrana)	10,0
	Reticolo endoplasmatico (lume)	10,0
<b>ApoA-I</b>	Citoplasma	45,0
	Perossisoma	30,0
	Matrice mitocondriale	10,0
	Membrana tilacoidale cloroplastica	10,0
<b>Apo93</b>	Citoplasma	45,0
	Perossisoma	42,6
	Matrice mitocondriale	10,0
	Reticolo endoplasmatico (membrana)	0,0
<i>pre-LCAT</i>	Apoplasto	53,7
	Perossisoma	29,1
	Reticolo endoplasmatico (membrana)	10,0
	Reticolo endoplasmatico (lume)	10,0

**Tabella 3.3:** Numero di espianti di tabacco cv Samsun NN co-coltivati con i diversi ceppi di agrobatterio, percentuale di espianti formanti callo e differenzianti germogli dopo 45 giorni dalla co-coltura.

Ceppo	Trattamento	Espianti		
		Trattati (n°)	Formanti callo (%)	Differenzianti germogli (%)
AT <i>apoA-I</i>	Controllo positivo	30	90,0 a	90,0 a
	Controllo negativo	30	0,0 b	0,0 b
	Co-coltivati	270	28,5 c	8,6 c
AT <i>apo93</i>	Controllo positivo	30	90,0 a	90,0 a
	Controllo negativo	30	0,0 b	0,0 b
	Co-coltivati	75	30,7 c	22,7 d
AT <i>apo174</i>	Controllo positivo	30	92,0 a	90,0 a
	Controllo negativo	30	0,0 b	0,0 b
	Co-coltivati	100	30,7 c	29,5 d
AT <i>lcat</i>	Controllo positivo	30	94,0 a	92,0 a
	Controllo negativo	30	1,2 b	0,0 b
	Co-coltivati	500	25,0 c	4,0 c

Lettere diverse (a,b,c,d) indicano differenze statisticamente significative per  $p \leq 0,05$ .

**Tabella 3.4:** Valutazioni di alcuni caratteri morfologici dopo 15 e 30 giorni di allevamento *in vivo* di piante di *N. tabacum* controllo e trasgeniche per ApoA-I. Sono riportati la lunghezza e la larghezza delle foglie al penultimo nodo, l'altezza della pianta dal primo nodo ed il numero di nodi intercorrenti tra il colletto e l'apice vegetativo.

Genotipo	Giorni di allevamento in vivo (n°)	Dimensioni foglie		Altezza dal primo nodo (cm)	Nodi tra l'apice ed il colletto (n°)
		largh. (cm)	lung. (cm)		
C- (1)	15	4,0	8,0	5,5	9
C- (2)	15	2,3	4,0	3,0	6
Ap11	15	3,5	7,0	3,8	9
Ap12	15	3,0	6,0	5,5	9
Ap13	15	3,0	4,5	2,0	6
Media $\pm$ dev. std.		3,2 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 1,7	4,0 $\pm$ 1,5	7,8 $\pm$ 1,6
C- (1)	30	6,5	11,5	13,0	10
C- (2)	30	4,0	8,0	8,0	9
Ap11	30	4,0	8,0	8,0	10
Ap12	30	6,0	11,5	13,0	10
Ap13	30	4,0	7,0	6,0	9
Media $\pm$ dev. std.		4,9 $\pm$ 1,2	9,2 $\pm$ 2,1	9,6 $\pm$ 3,2	9,6 $\pm$ 0,5

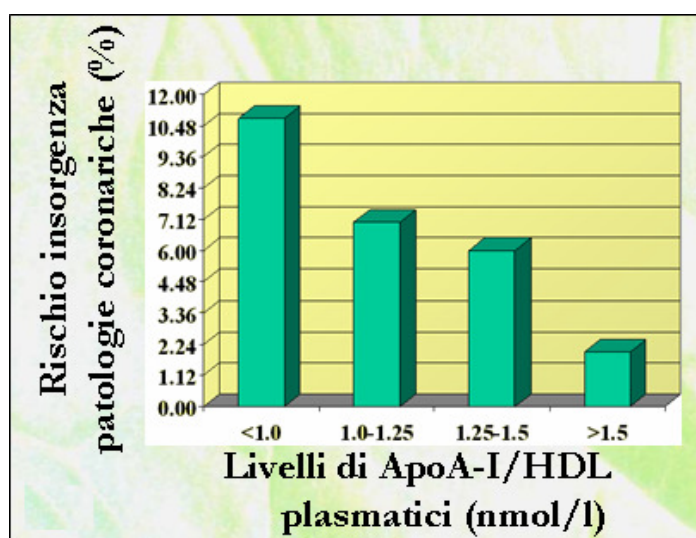
**Tabella 3.5:** Valutazioni di alcuni caratteri morfologici dopo 15 giorni di coltura *in vivo* di un controllo non transgenico di *N. tabacum* e di 6 piante transgeniche LC. In tabella sono riportati la lunghezza e la larghezza delle foglie al penultimo nodo, l'altezza della pianta dal primo nodo ed il numero di nodi intercorrenti tra il colletto e l'apice vegetativo.

Genotipo	Giorni di allevamento in vivo (n°)	Dimensioni foglie		Altezza dal primo nodo (cm)	Nodi tra l'apice ed il colletto (n°)
		largh. (cm)	lung. (cm)		
C-	15	4,5	11	18	9
LC2	15	3	8	16,5	8
LC6	15	5,5	10,5	21	10
<b>LC13</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>3,5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
LC18	15	3,5	9	15	7
LC27	15	4	9	19	8
LC34	15	4,5	10	20	8
Media $\pm$ dev. std.		3,8 $\pm$ 1,1	8,7 $\pm$ 2,5	16,3 $\pm$ 5,4	8,1 $\pm$ 1,1

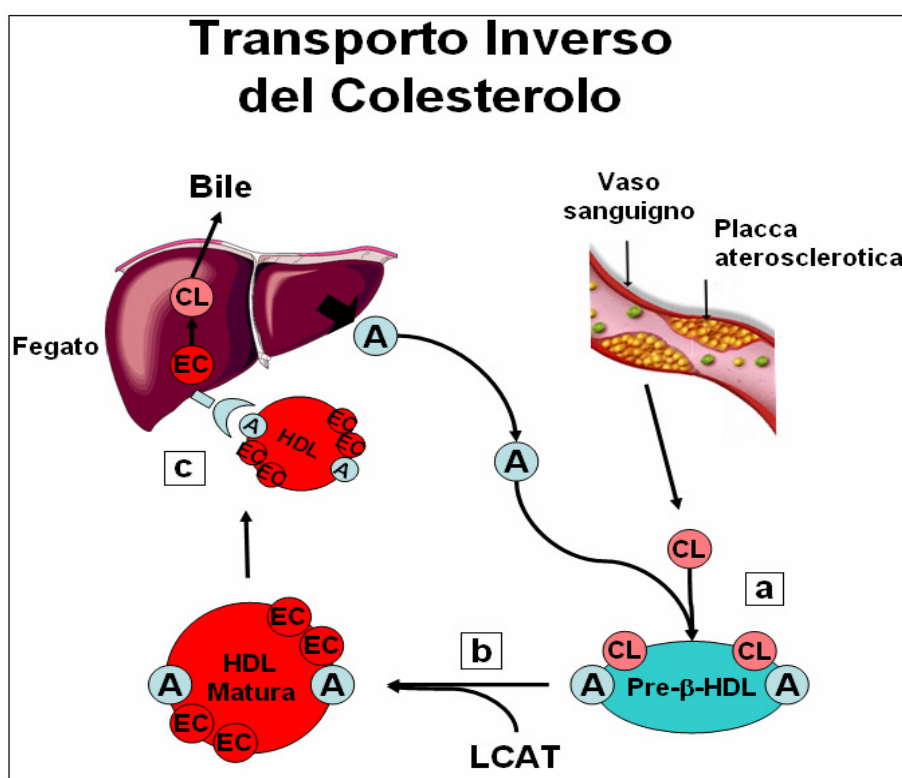
**Tabella 3.6:** Analisi di segregazione del carattere “resistenza alla kanamicina” (Kan<sup>+</sup>), per la stima del numero di copie del trasgene integrate nel genoma, di piante Ap-T<sub>1</sub>, AM-T<sub>1</sub> e LC-T<sub>1</sub>. In tabella sono riportati il genotipo, il numero di piantine T<sub>1</sub> risultate Kan<sup>+</sup> e Kan<sup>-</sup>, i risultati dell’analisi del  $\chi^2$  per i rapporti 3:1 e 15:1, ed il numero di copie del trasgene stimato.

Genotipo	Segreganti (Kan+:Kan-)	$\chi^2$		Stima numero di copie del trasgene
		3:1	15:1	
Ap11	90:1	12,00	2,40	2
Ap12	91:9	13,65	1,29	2
Ap13	80:20	1,33	32,27	1
Ap15	71:29	0,85	88,33	1
Ap17	68:32	2,61	113,16	1
Ap18	73:27	0,21	73,48	1
AM37	93:7	17,28	0,10	2
AM40	78:22	0,48	42,34	1
AM47	85:15	5,33	5,64	?
AM51	83:17	3,41	19,72	1
AM54	72:28	0,48	80,74	1
AM57	76:24	0,05	53,77	1
LC2	93:7	19,25	0,10	2
LC6	70:30	1,33	96,27	1
LC13	80:20	1,33	32,27	1
LC18	92:8	15,41	0,52	2
LC27	69:31	1,92	104,54	1
LC34	89:11	10,45	3,85	2

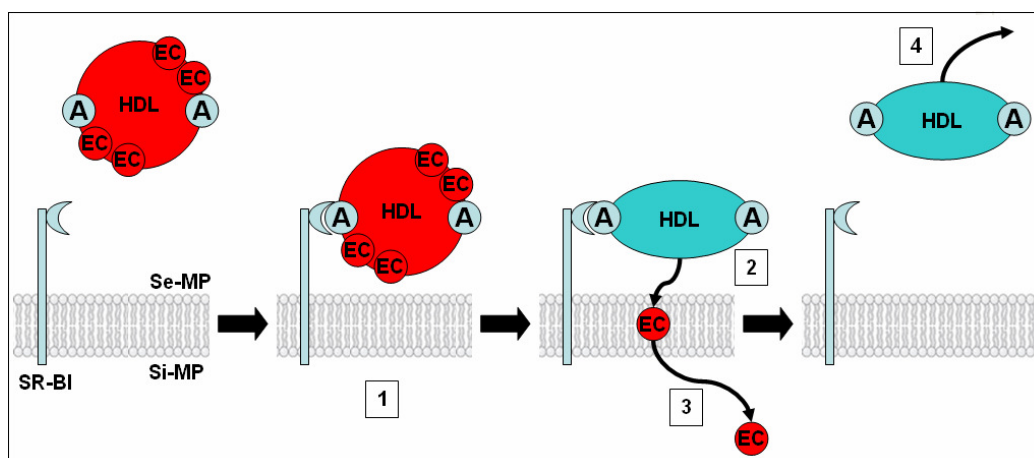
Un valore del  $\chi^2$  superiore a 3,84 indica differenze statisticamente significative dall’ipotesi fatta. L’ipotesi fatta deve essere rifiutata.



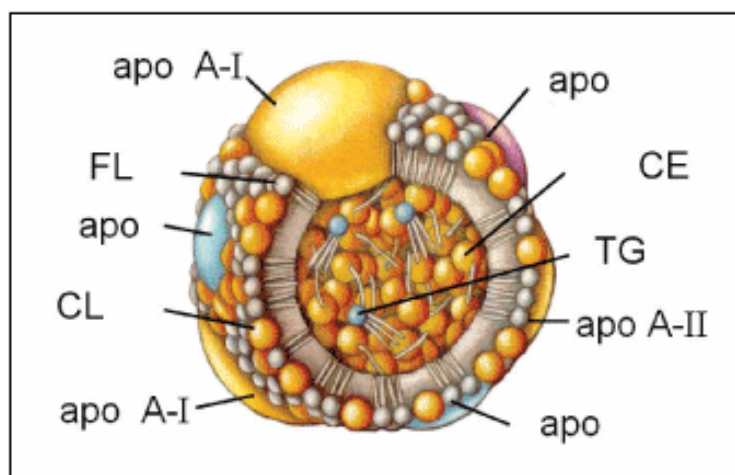
**Figura 1.1:** Relazione esistente tra i livelli di HDL plasmatici (nmol/l) e la percentuale di rischio di sviluppare patologie coronariche (Gordon e Rifkind, 1989).



**Figura 1.2:** Schema grafico del “trasporto inverso del colesterolo” in cui è coinvolta la ApoA-I. A, apolipoproteina ApoA-I; CL, colesterolo libero; EC, esteri di colesterolo; LCAT, lecitina colesterolo aciltrasferasi. [a] la ApoA-I, secreta dal fegato, lega il colesterolo libero presente nei tessuti periferici; [b] attiva la LCAT che esterifica il colesterolo libero permettendo la maturazione del complesso HDL, stabilizzato dalla stessa ApoA-I; [c] interagisce con il recettore presente sulle cellule epatiche permettendo il rilascio del colesterolo accumulato (immagine adattata da <http://www.lipidsonline.org>).

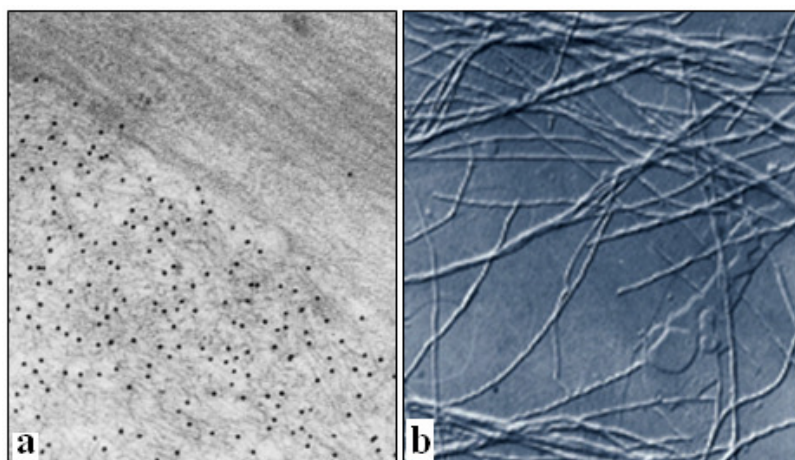


**Figura 1.3:** Schema grafico dell'interazione della ApoA-I con il recettore SR-BI, presente sulle cellule epatiche. [1] interazione ApoA-I/SR-BI; [2] rilascio dei lipidi; [3] trasporto dei lipidi all'interno della cellula; [4] rilascio del complesso HDL "svuotato" del colesterolo raccolto dai tessuti periferici. A, apolipoproteina ApoA-I; EC, esteri di colesterolo; Se-MP, superficie esterna della membrana plasmatica; Si-MP, superficie interna della membrana plasmatica (immagine adattata da <http://www.lipidsonline.org>).

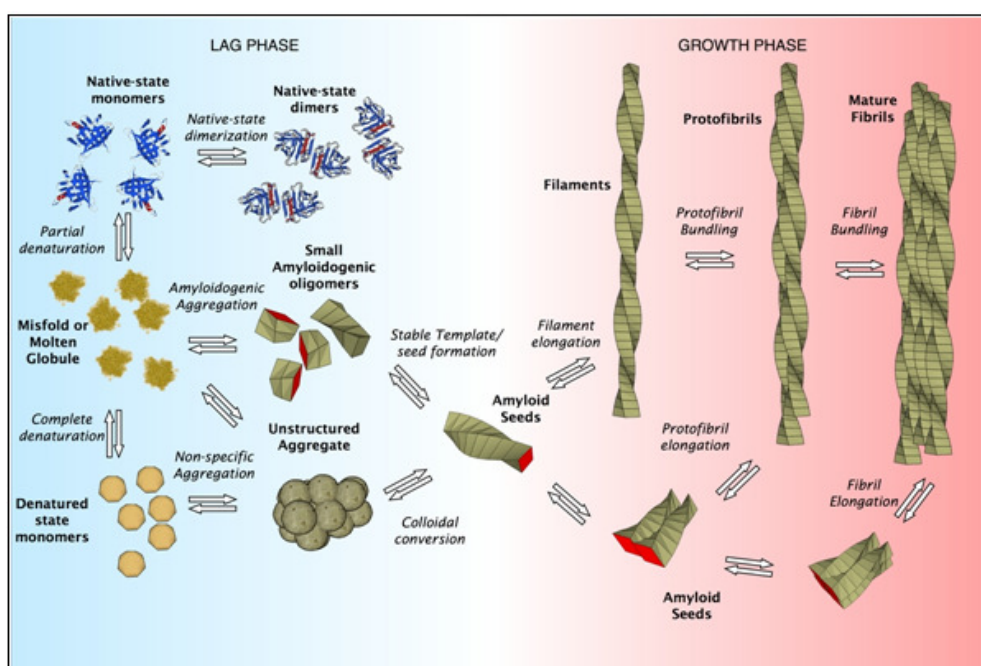


**Figura 1.4:** Modello schematico del complesso HDL. ApoA-I, apolipoproteina A-I; FL, fosfolipidi; CE, colesterolo esterificato; CL, colesterolo; TG, trigliceridi. ([http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2006001800019&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2006001800019&script=sci_arttext&tlng=en)).

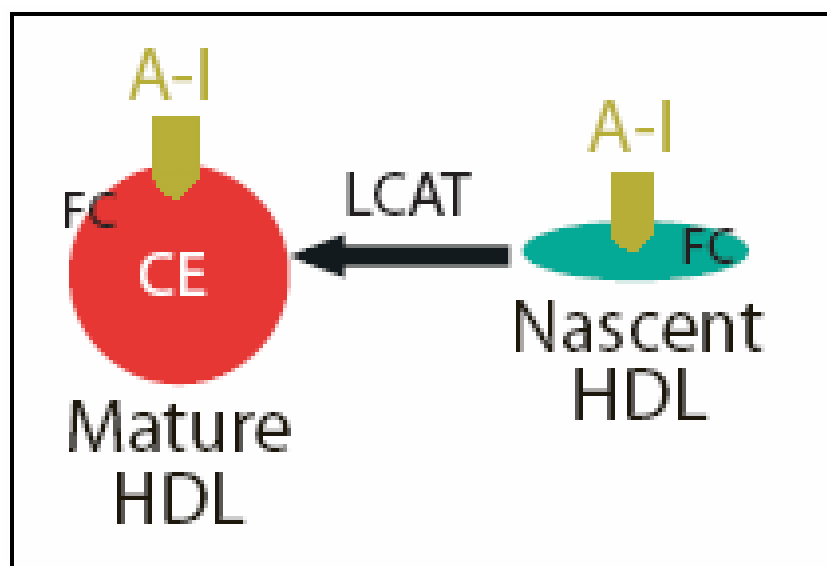




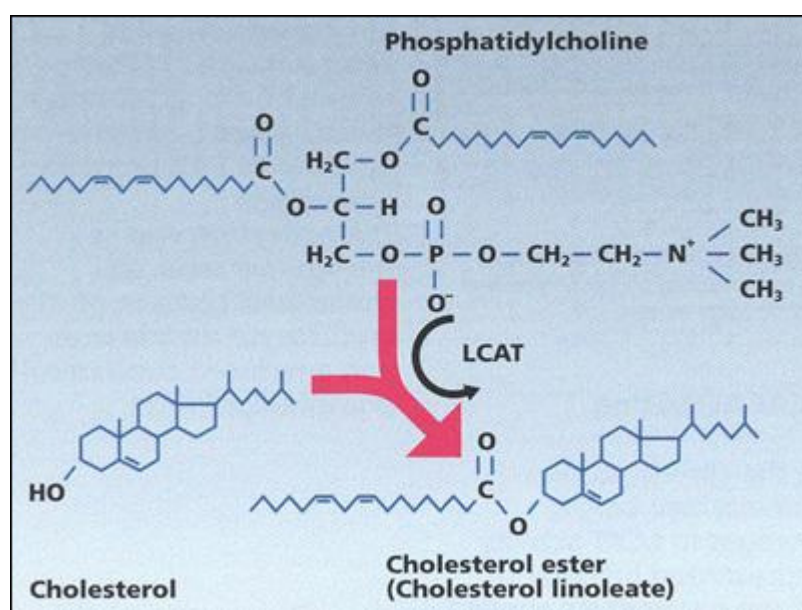
**Figura 1.5:** Fibrille presenti in un tessuto cardiaco affetto da amiloidosi (a, da Obici *et al.*, 1999) e *in vitro* (b), osservate al microscopio elettronico.



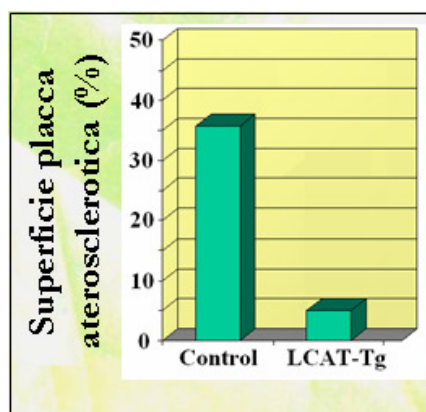
**Figura 1.6:** Schema grafico della fibrillogenesi (immagine da <http://talaga.rutgers.edu/research/amyloid.php>).



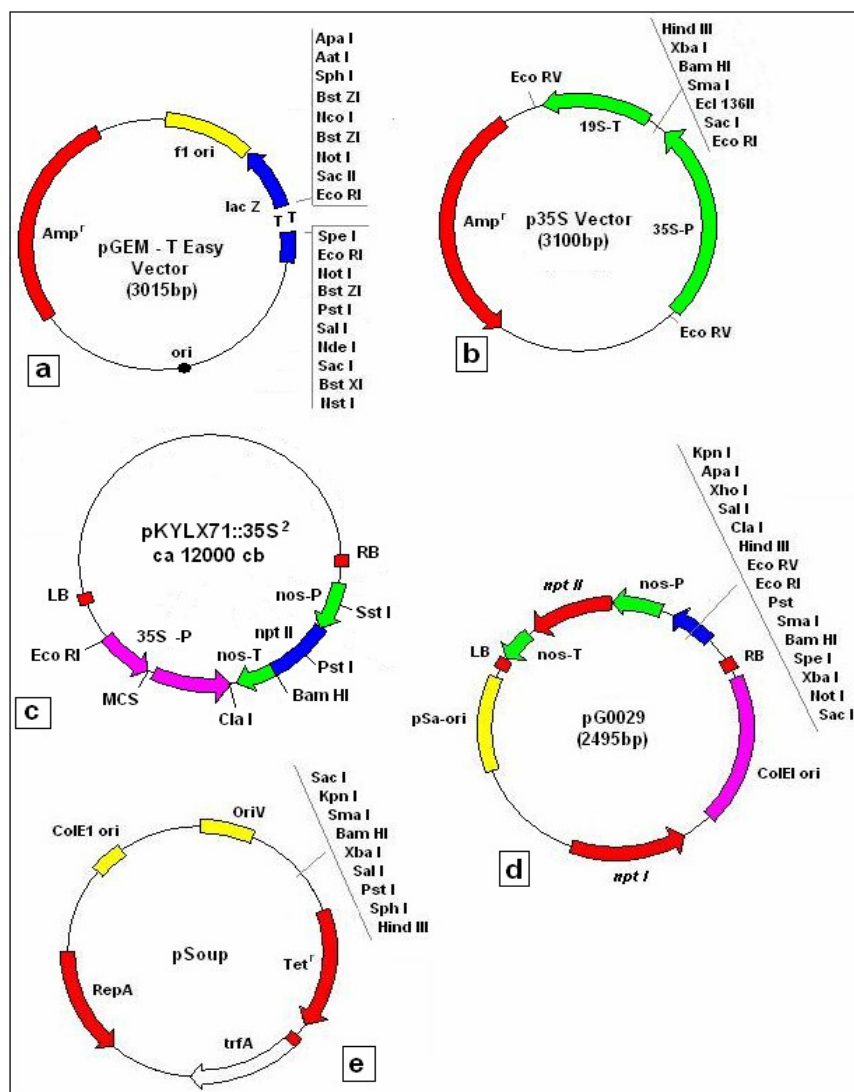
**Figura 1.7:** Maturazione del complesso HDL mediante esterificazione del colesterolo da parte dell'enzima LCAT ([http://www.meducator.org/archive/20040329/03\\_RCT.gif](http://www.meducator.org/archive/20040329/03_RCT.gif)).



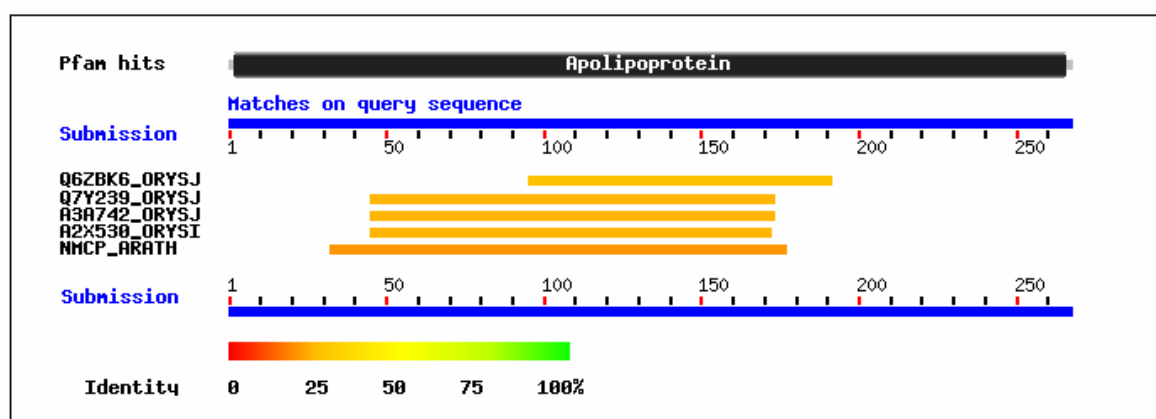
**Figura 1.8:** Esterificazione del colesterolo mediata dall'enzima LCAT (<http://www.heartfixer.com/CHC%20-%20Treatments%20-%20PC.htm>).



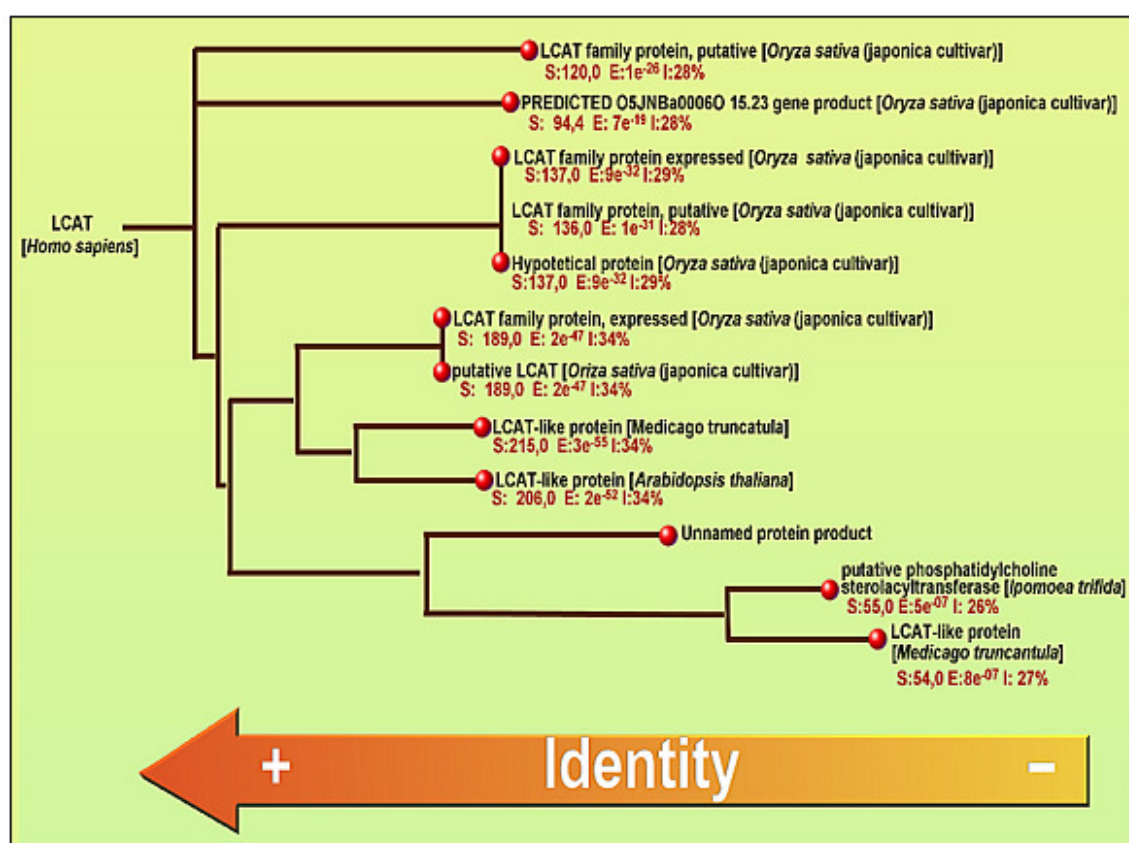
**Figura 1.9:** Riduzione percentuale delle placche aterosclerotiche in conigli trasgenici sovraesprimenti la LCAT umana (Hoeg *et al.*, 1996).



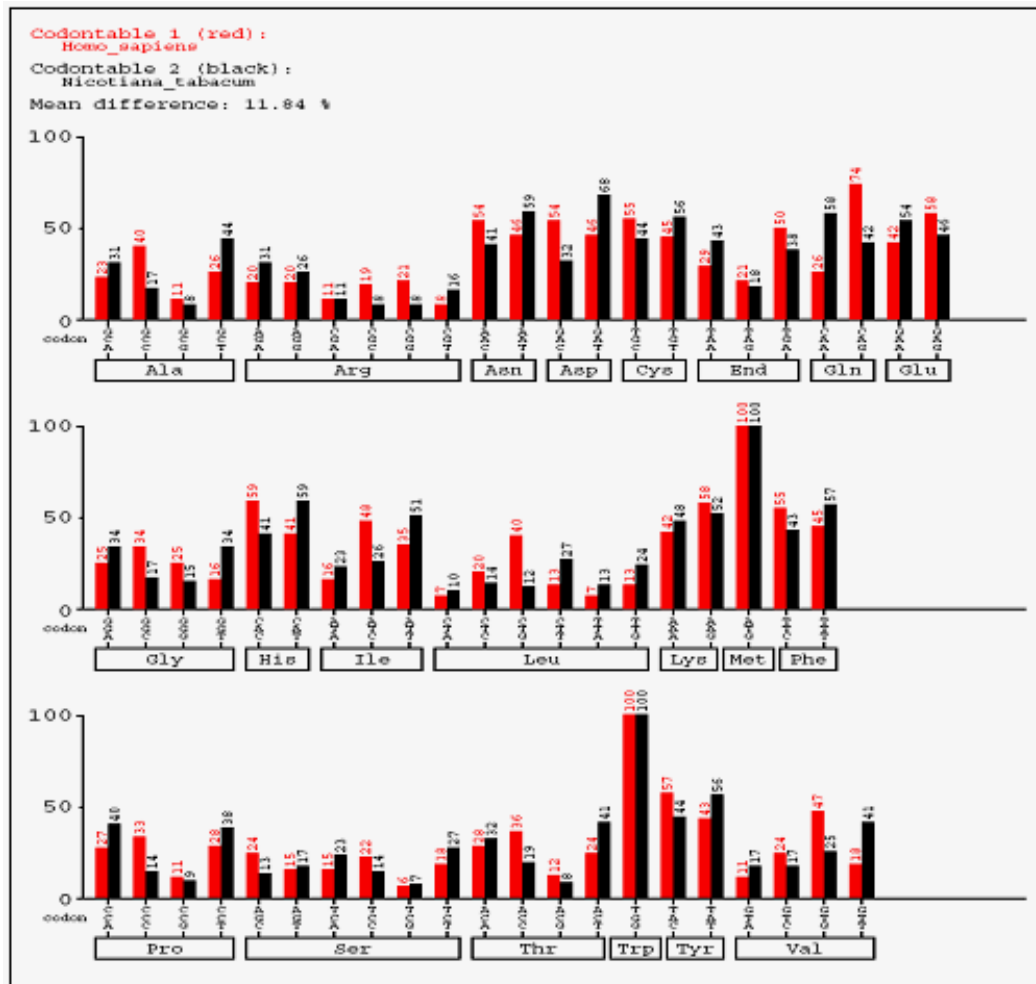
**Figura 2.1:** Mappa dei vettori utilizzati nel presente studio. Immagine adattata da: Promega (pGEM T-easy), <http://www.pgreen.ac.uk/> (pG35S, pG0029 e pSOUP) e Schardl *et al.*, 1987 (pKYLX71).



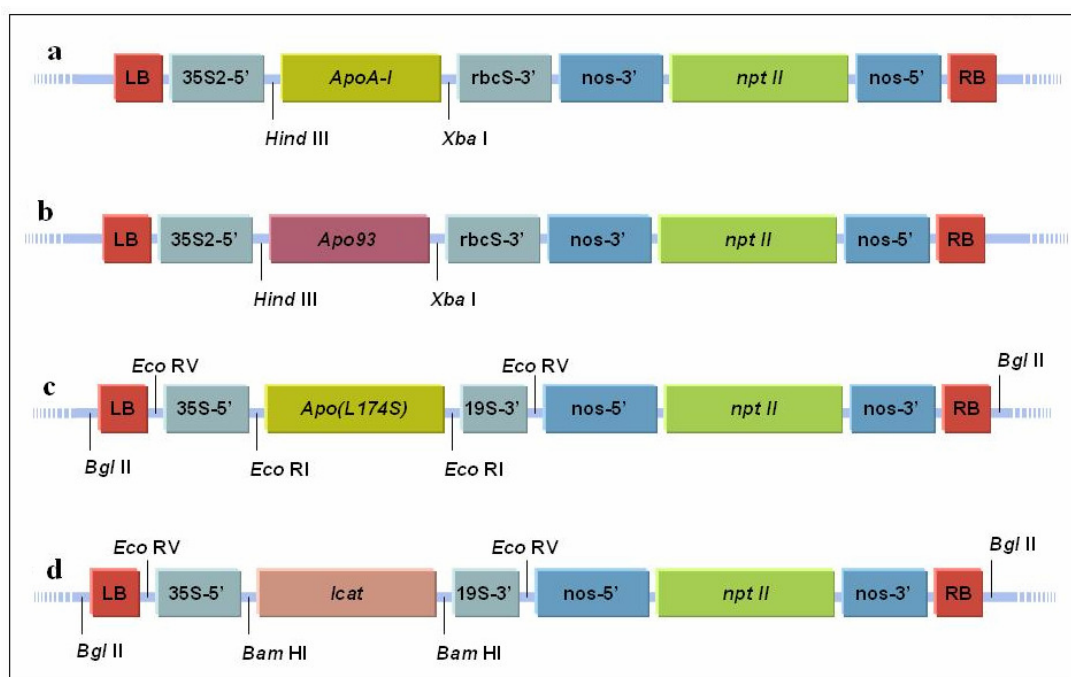
**Figura 3.1:** Allineamento della sequenza aminoacidica di ApoA-I con polipeptidi presenti nella banca dati *Viridiplantae* (<http://www.expasy.org/tools/blast>).



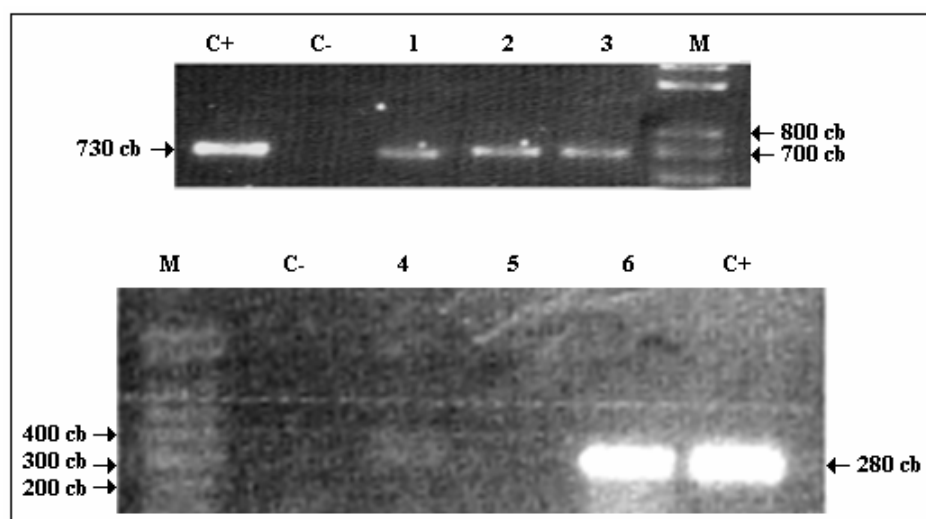
**Figura 3.2:** Risultato dell'allineamento delle sequenze proteiche della LCAT umana con le sequenze proteiche presenti nel database "*Viridiplantae*". Il dendrogramma mostra i gruppi di *accessioni* selezionate per alto *punteggio*. Il braccio più corto rappresenta la proteina da pianta più simile alla LCAT umana, considerando nell'insieme i valori dello *Score* (S), dell'*E-value* (E) e della percentuale di identità aminoacidica (I).



**Figura 3.3:** Analisi del *codon usage* effettuata mediante il programma “Graphical Codon Usage Analyser”. In media, la differenza percentuale tra i codoni rappresentati nel genoma umano (barre rosse) ed il *codon usage* di *N. tabacum* (barre nere) è risultata essere dell’11,8%.

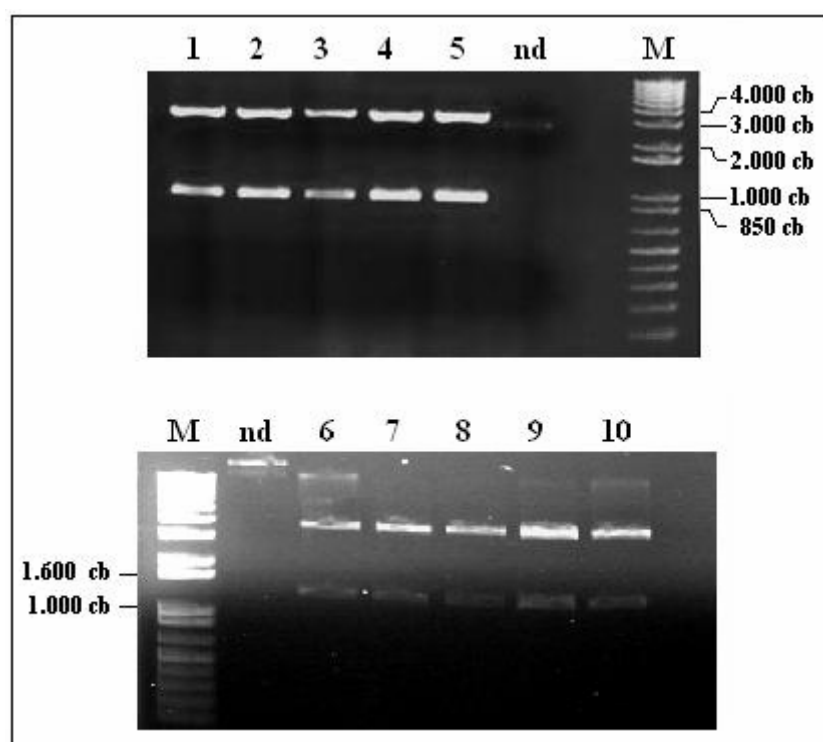


**Figura 3.4:** Schema delle cassette per l'espressione in tabacco costruite per la sequenza genica *apoA-I* (a), *apoA-I/93* (b), *apoA-I(L174S)* (c) e *lcat* (d).

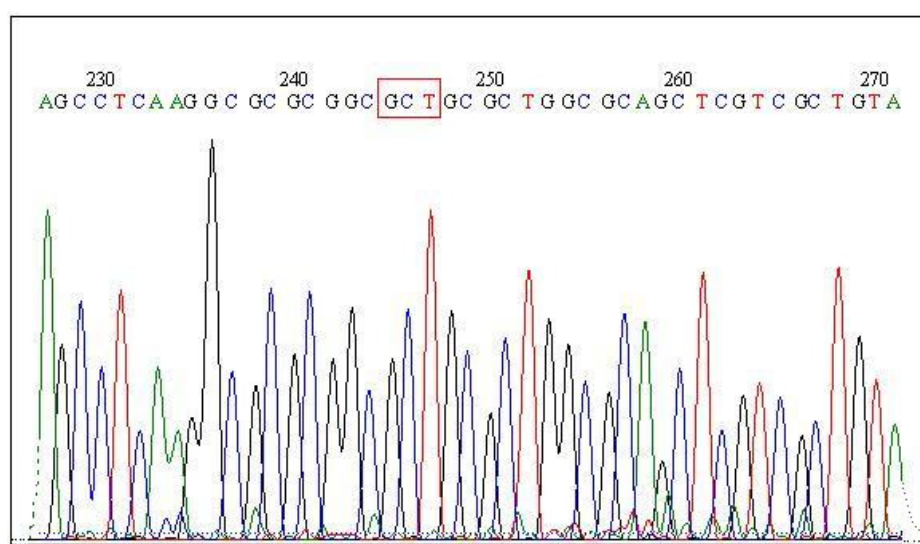


**Figura 3.5:** Analisi di amplificazione del pDNA di colonie di *E. coli* trasformate. *Legenda:* C+, amplificato dal vettore pET11-a::*apoA-I*; C-, amplificato da colonia non trasformata; corsie da 1-3, colonie di *E. coli* trasformate con pKY::*apoA-I*; corsie 4-6, colonie di *E. coli* trasformate con pKY::*apo93*; M, 1 Kb Plus DNA ladder (GIBCO BRL).

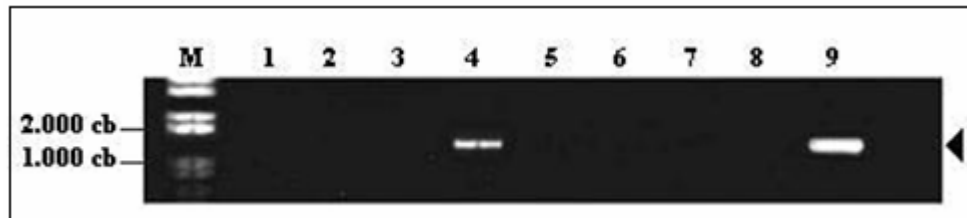




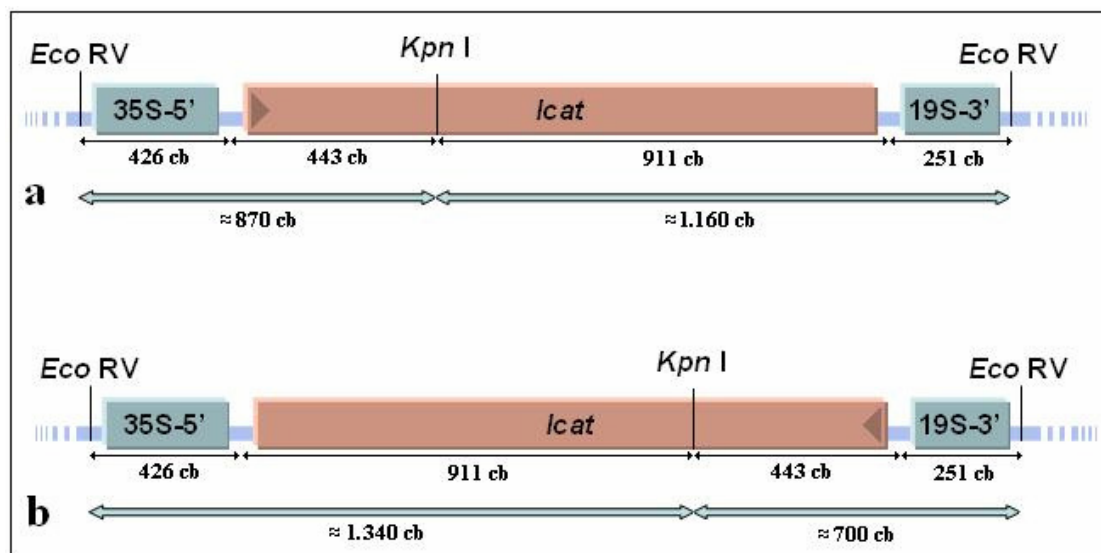
**Figura 3.6:** Gel elettroforetico dei prodotti di digestione del vettore pGEM per verificare l'inserimento dei cDNA di *apoA-I(L174S)* e *Icat*. Legenda: corsie da 1 a 5, pDNA estratti da colonie di *E. coli* trasformate con il vettore pGEM::*apoA-I(L174S)*, digerito con *EcoRI*; corsie 6-10, pDNA estratti da colonie di *E. coli* trasformate con il vettore pGEM::*Icat* digerito con *BamHI*; nd, non digerito; M, 1 Kb Plus DNA ladder (GIBCO BRL).



**Figura 3.7:** Cromatogramma parziale ottenuto dal sequenziamento del frammento *apoA-I(L174S)* clonato nel vettore pGEM. La tripletta mutata è evidenziata dal riquadro in rosso.

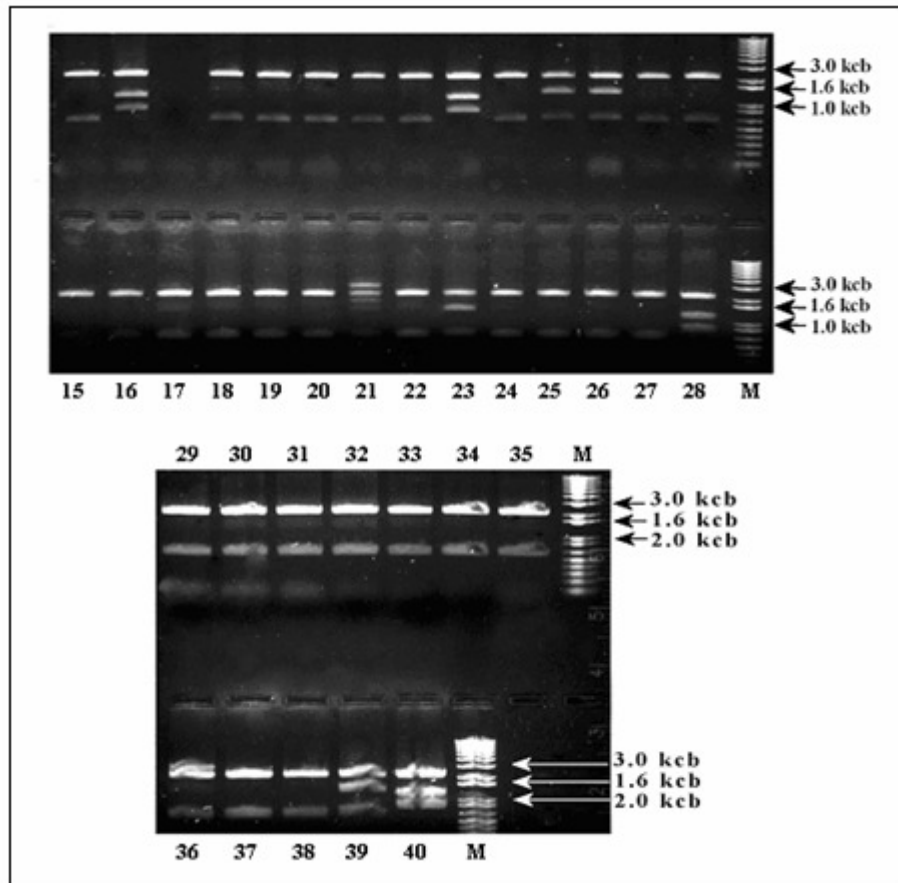


**Figura 3.8:** Gel elettroforetico dei prodotti di amplificazione dei pDNA estratti da colonie di *E. Coli* trasformate con il prodotto di ligazione p35S::*apoA-I*(L174S), mediante i primer “PfEcoRV” e “351R”. Legenda: M, 1Kb Plus DNA ladder (GIBCO BRL); corsie da 1 a 9, colonie di *E. coli* trasformate.

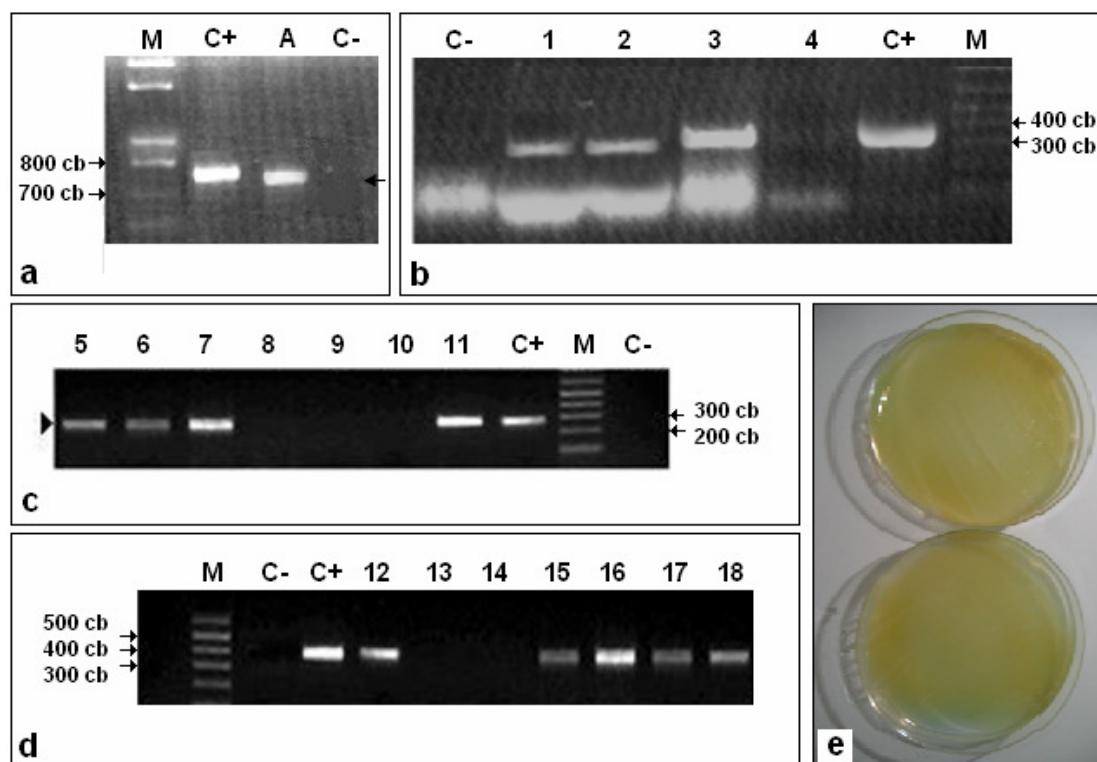


**Figura 3.9:** Costrutto P35S-*lcat*-T19S. I siti di restrizione *EcoRV* e *KpnI* hanno permesso l'identificazione dei costrutti con il corretto orientamento (a) e con orientamento opposto (b) del frammento *lcat*. Lunghezza dei frammenti corrispondenti alle bande attese in caso di orientamento corretto: ≈870 cb, ≈1.160 cb e ≈2.050 cb. Lunghezza dei frammenti corrispondenti alle bande attese in caso di orientamento opposto: ≈700 cb, ≈1.340 cb e ≈2.050 cb.

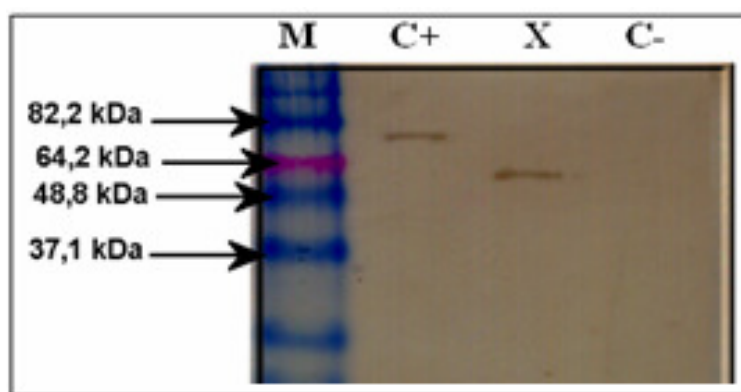




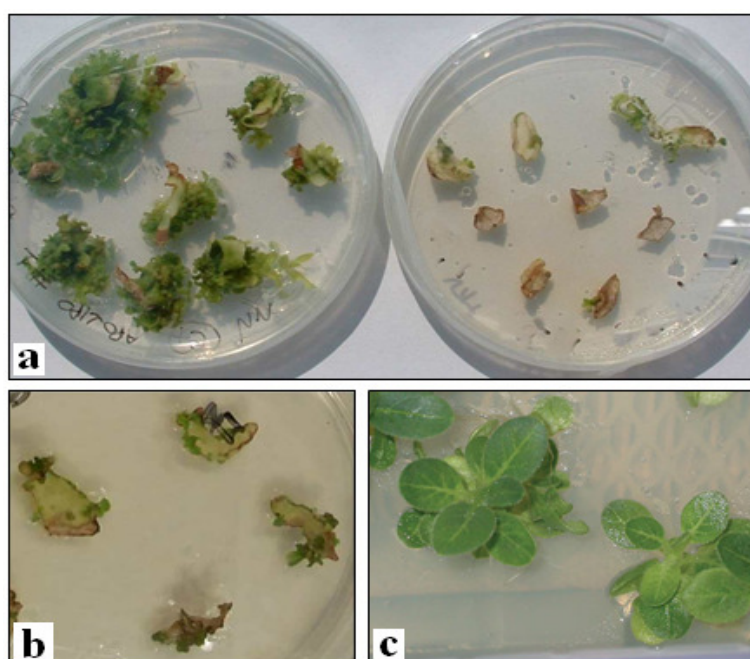
**Figura 3.10:** Gel elettroforetico dei prodotti di digestione del vettore PG35S::*lcat* con gli enzimi *EcoRV* e *KpnI* per verificare il corretto orientamento della sequenza *lcat* rispetto al promotore 35S ed al terminatore 19S. Nei campioni 2, 9, 28 e 40 sono presenti le bande da  $\approx 900$ ,  $\approx 1.150$  e  $\approx 2.050$  che indicano l'inserimento della sequenza codificante nel corretto orientamento. Legenda: corsie 1-40, colonie di *E.coli* trasformate con pG35S::*lcat*; M, 1 Kb Plus DNA ladder.



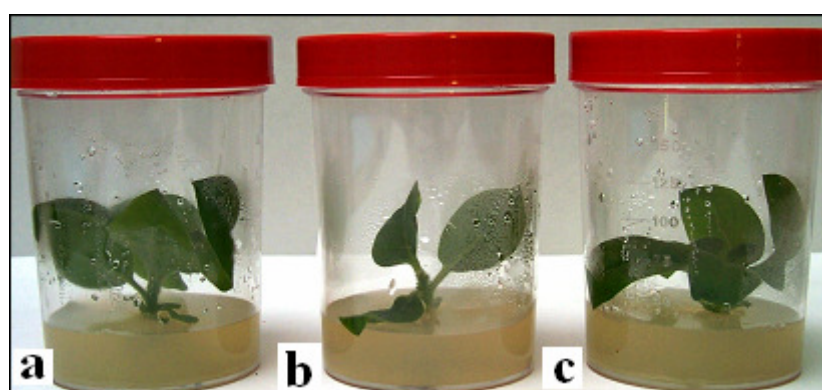
**Figura 3.11:** Gel di elettroforesi dei prodotti di amplificazione del DNA di colonie di *A. tumefaciens* trasformate con pKY::apoA-I (a), con pKY::apoA-I/93 (b), con pG0029::apoA-I(L174S) (c) e pG0029::lcat (d); e risultato del saggio di Benedict effettuato su alcuni ceppi di *A. tumefaciens* trasformati (e). Legenda: corsie A e 1-18, pDNA estratto da colonie di *A. tumefaciens* trasformate; C+, vettori recante il cDNA di interesse; M, 1Kb Plus DNA ladder; C-, pDNA estratto da colonie di *A. tumefaciens* non trasformate.



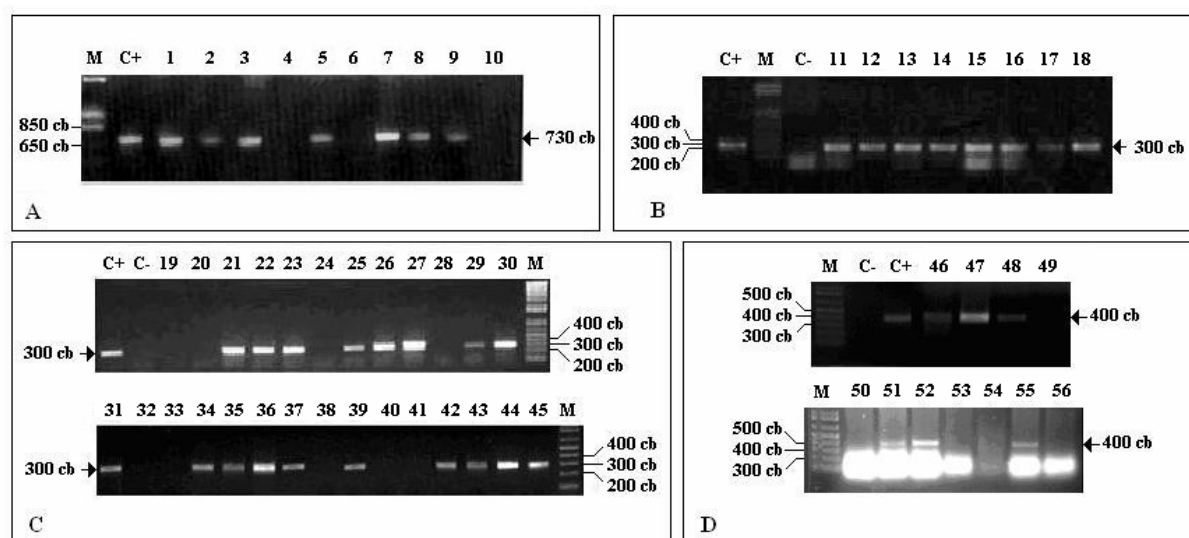
**Figura 3.12:** Analisi Western delle proteine totali isolate da foglie di *N. tabacum* cv Samsun NN dopo 2 giorni dall'agroinfiltrazione con il ceppo di *A. tumefaciens* AT/lcat. Legenda: M, BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (INVITROGEN); C+, proteina LCAT purificata; X, proteine isolate da tessuto fogliare di pianta trasformata mediante agroinfiltrazione; C-, proteine isolate da foglie di tabacco non transgenico.



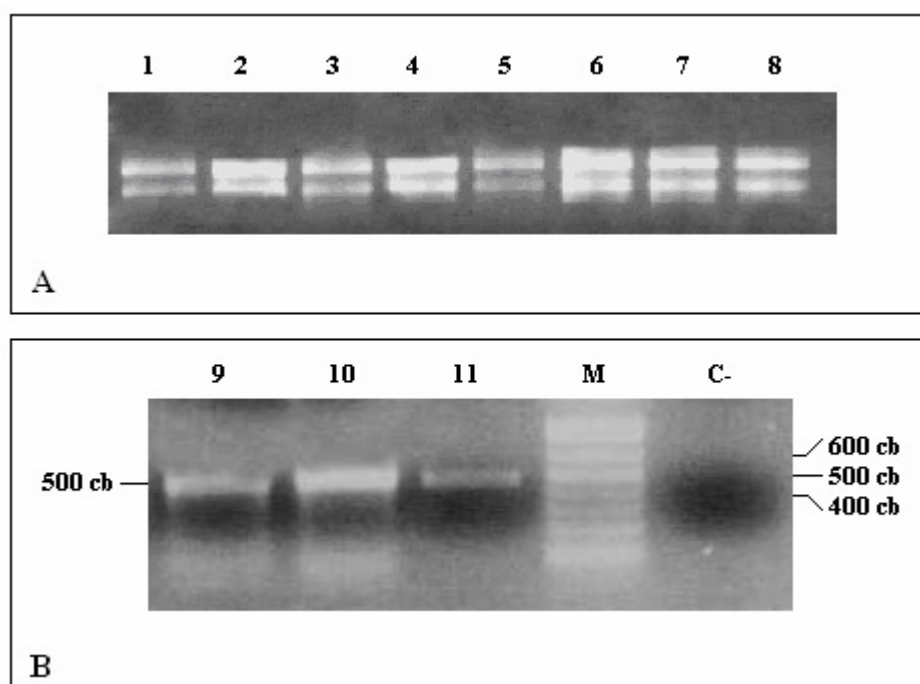
**Figura 3.13:** Ottenimento dei germogli putativi transgenici da espianti fogliari di tabacco cv Samsun NN posti su mezzo di differenziamento. A) Espianti non co-coltivati posti su substrato privo di kanamicina (sinistra) e, espianti co-coltivati con il ceppo di agrobatterio ATapoA-I (destra), posti su substrato contenente kanamicina. B) Germogli di tabacco putativi transgenici per *apo93* differenziatisi dopo 45 giorni di coltura *in vitro*. C) Germogli putativi transgenici per *apoA-I*, posti su substrato di radicazione contenente l'antibiotico selettivo.



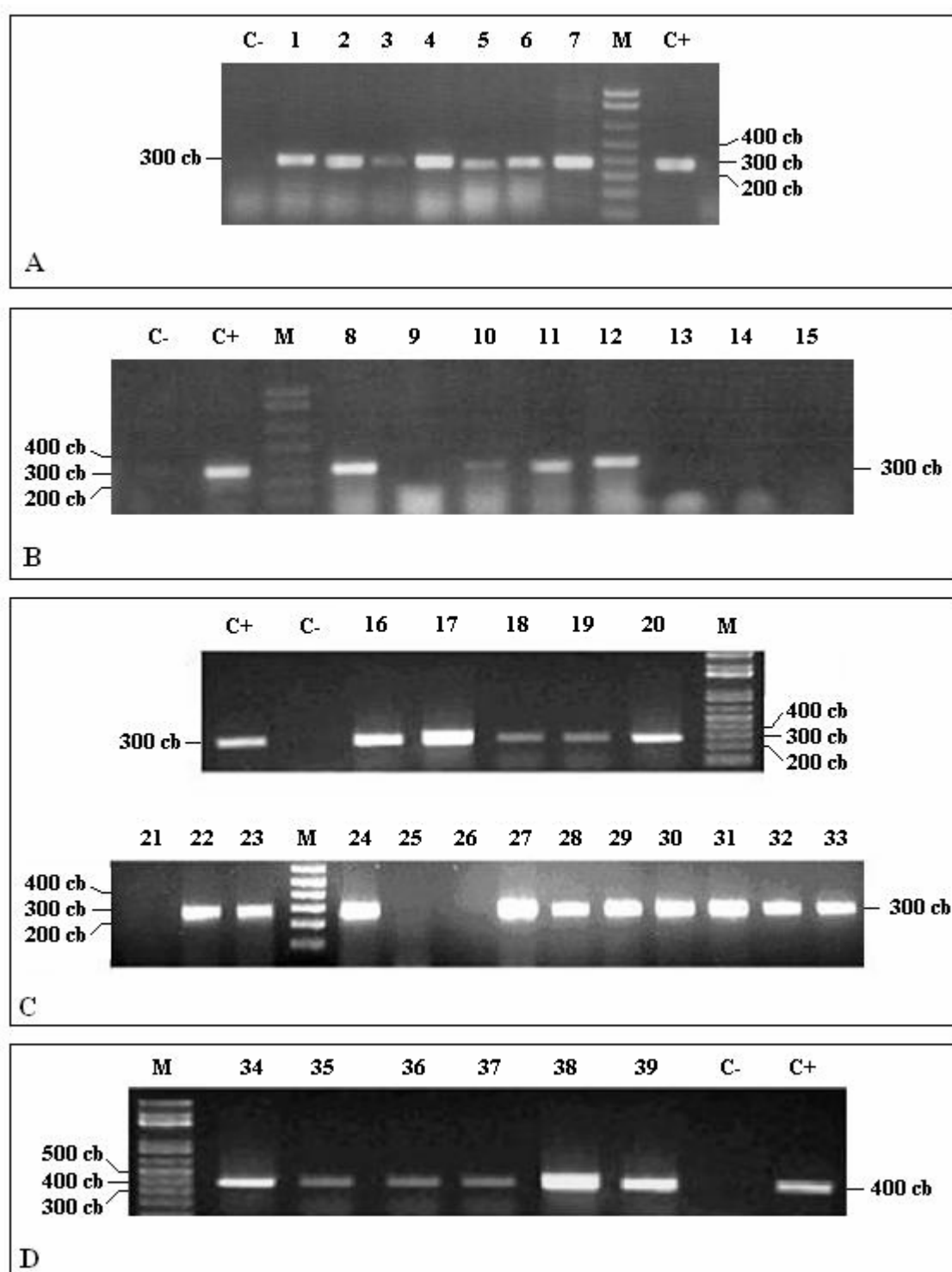
**Figura 3.14:** Germogli di *N. tabacum* cv Samsun NN differenziatisi da espianti fogliari co-coltivati con *A. tumefaciens* e trasferiti su substrato di radicazione *in vitro*. Legenda: a) piantina sviluppata da germoglio differenziato da espianto non co-coltivato in assenza di antibiotico selettivo; b e c) germogli derivanti dalla co-coltura con i ceppi di agrobatterio ATapo93 (b), e ATapoA-I (c).



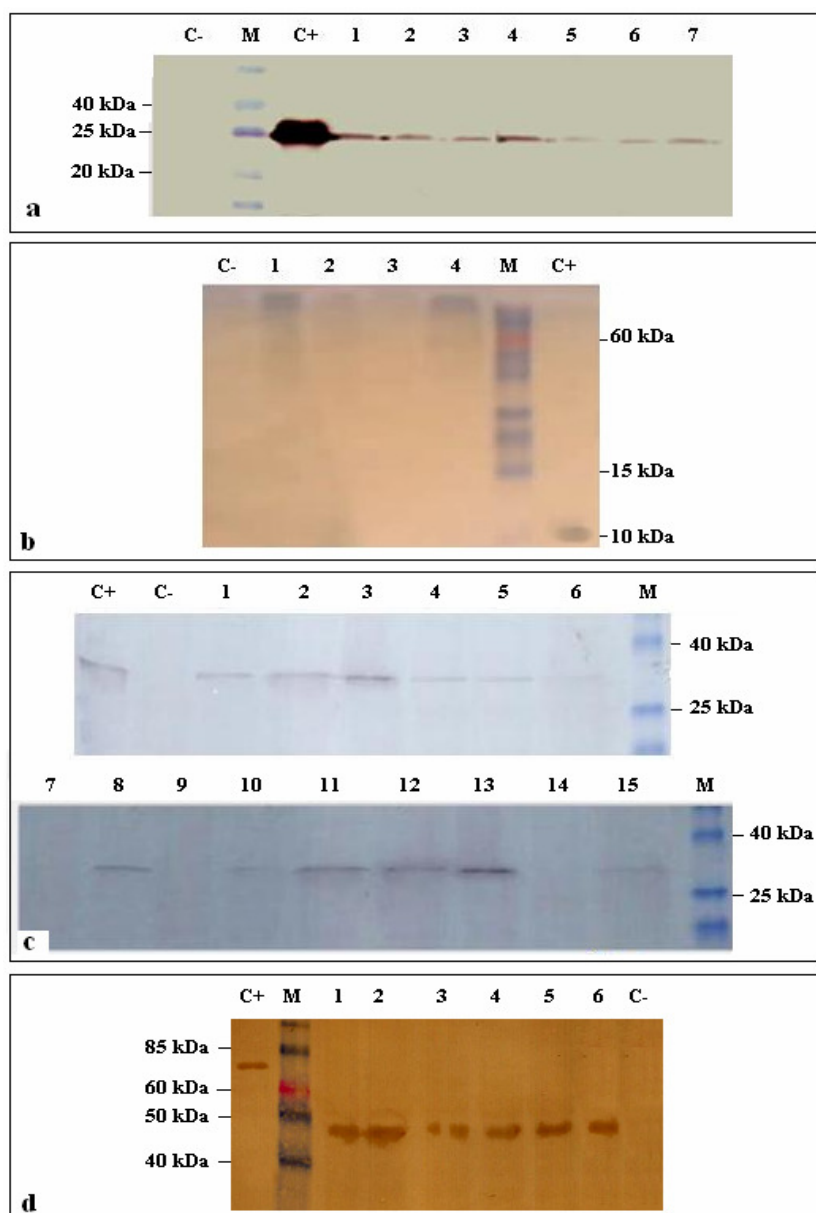
**Figura 3.15:** Gel di elettroforesi dei prodotti di amplificazione con *primer* specifici, per ciascun costrutto, sul DNA genomico estratto da piante di tabacco trasformate per *apoA-I* (A), *apo93* (B), *apoA-I(L174S)* (C) e *lcat* (D), radicate su mezzo selettivo. Legenda: M, 1Kbp ladder; C+, DNA plasmidico contenente i frammenti di interesse; C-, DNA isolato da pianta di tabacco non trasformata; corsie 1-56, DNA isolato da piante di tabacco putative trasgeniche.



**Figura 3.16:** A) Corsa elettroforetica dell'RNA totale estratto da foglia di 8 piante trasgeniche. Legenda: corsie 1-4, piante trasgeniche per *apoA-I*; corsie 5-8, piante trasgeniche per *apo93*. B) Risultato dell'analisi RT-PCR condotta sui cDNA delle piante trasgeniche con i *primer* specifici per la subunità ribosomiale 18S di *N. tabacum*. Legenda: C-, DNA isolato da *Solanum tuberosum*; M, 1Kbp ladder; corsia 9 e 10, piante trasgeniche per *apoA-I*; corsia 11, pianta trasgenica per *apo93*.

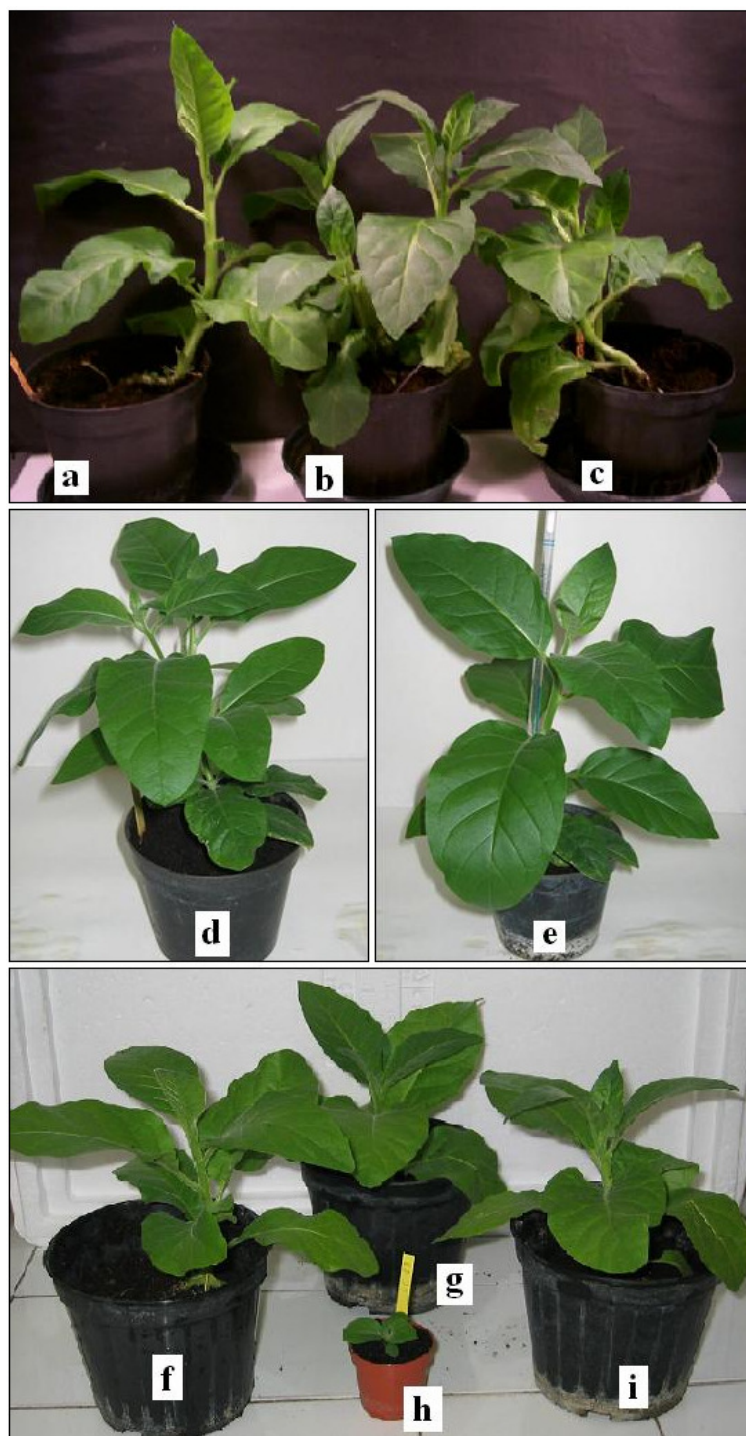


**Figura 3.17:** Analisi RT-PCR condotta sui cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione dell'RNA totale estratto da piante transgeniche, con *primer* specifici per ciascun costrutto. Legenda: C+, DNA genomico isolato da pianta transgenica; C-, DNA genomico isolato da tabacco non transgenico; M, *1Kbp ladder* (GIBCO BRL); corsie da 1 a 7, piante transgeniche Ap; corsie da 8 a 15, piante A93; corsie da 16 a 33, piante AM; corsie 34-93, pianta LC.

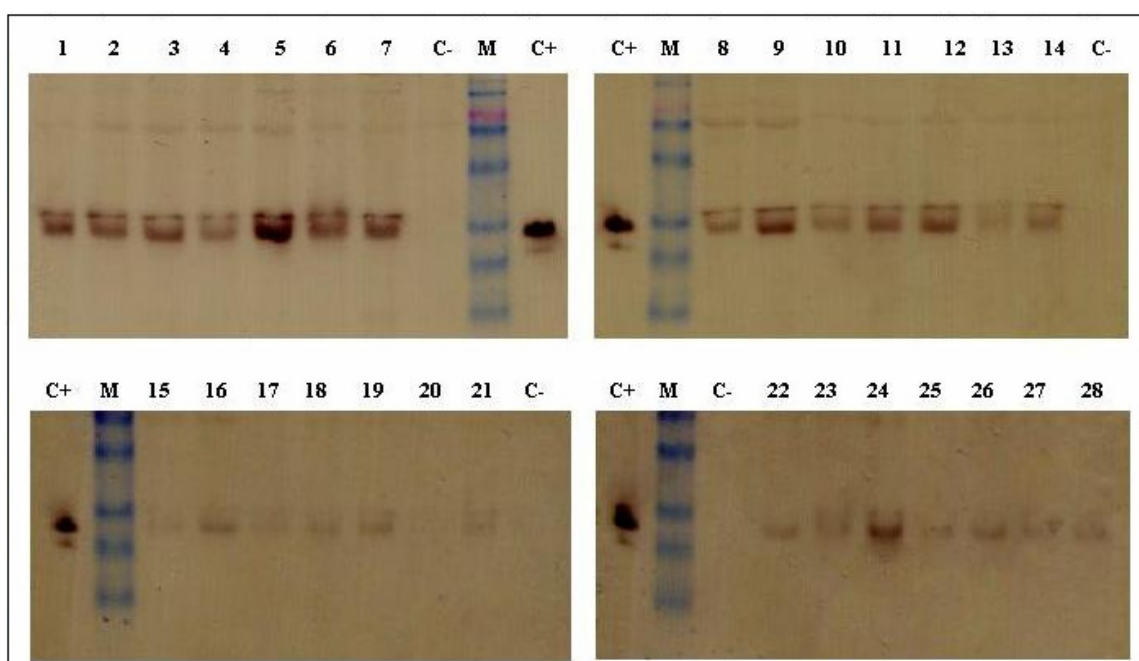


**Figura 3.18:** Analisi western delle proteine totali solubili isolate da foglie di piante Ap (a), A93 (b), AM (c) e LC (d). *Legenda:* C-, proteine totali isolate da tabacco non transgenico; C+, proteina purificata utilizzata come controllo positivo; M, *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (INVITROGEN).

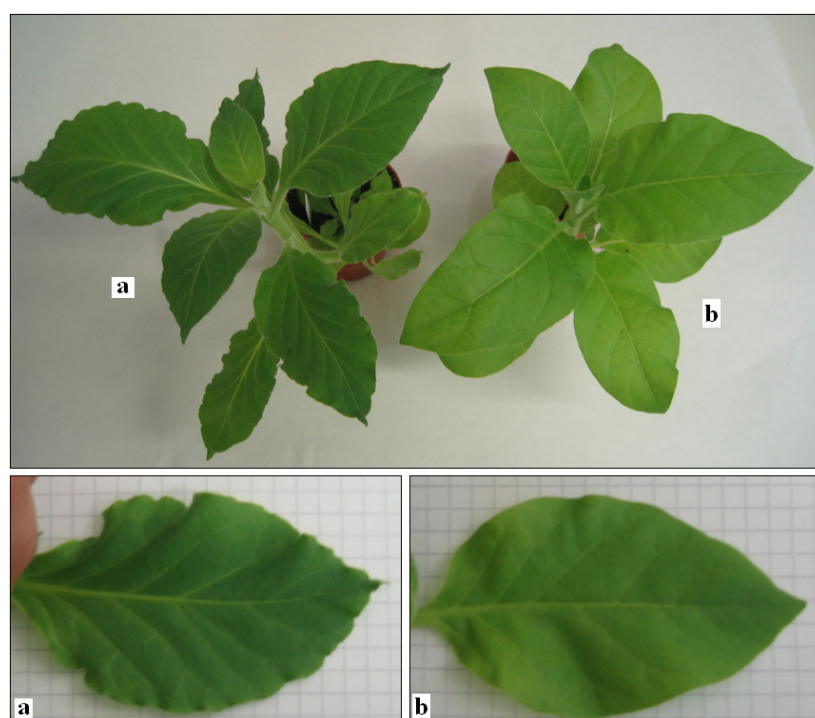




**Figura 3.19:** Piante di *N. tabacum* transgeniche Ap (a e b), AM (d) e LC (f, g e h). Le piante contrassegnate con c, e ed i sono piante non trasformate usate come controllo negativo.

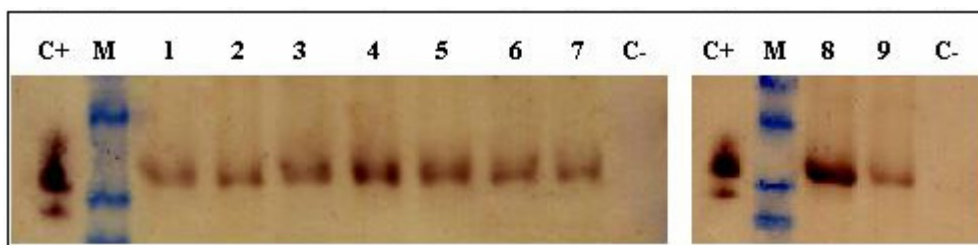


**Figura 3.20:** Analisi western delle proteine totali solubili estratte da tessuto fogliare di piante Apo-T<sub>1</sub>. *Legenda:* C-, proteine totali isolate da tabacco non transgenico; C+, proteina purificata utilizzata come controllo positivo; M, *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (INVITROGEN); 1-4 e 15-17, progenie della pianta A13; 5-7 e 18-21, progenie della pianta A15; 8-11 e 22-24, progenie della pianta A17; 12-14 e 25-28, progenie della pianta A18.

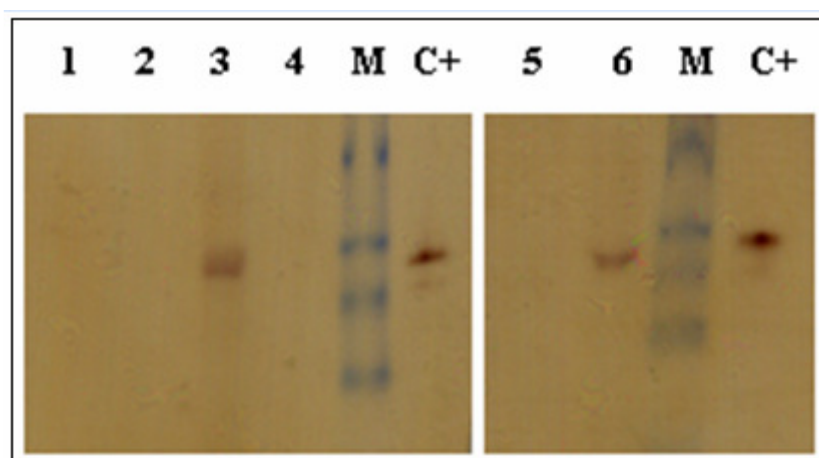


**Figura 3.21:** Pianta di *N. tabacum* transgenica Ap15-2 (a) e pianta non trasformata usata come controllo negativo (b).

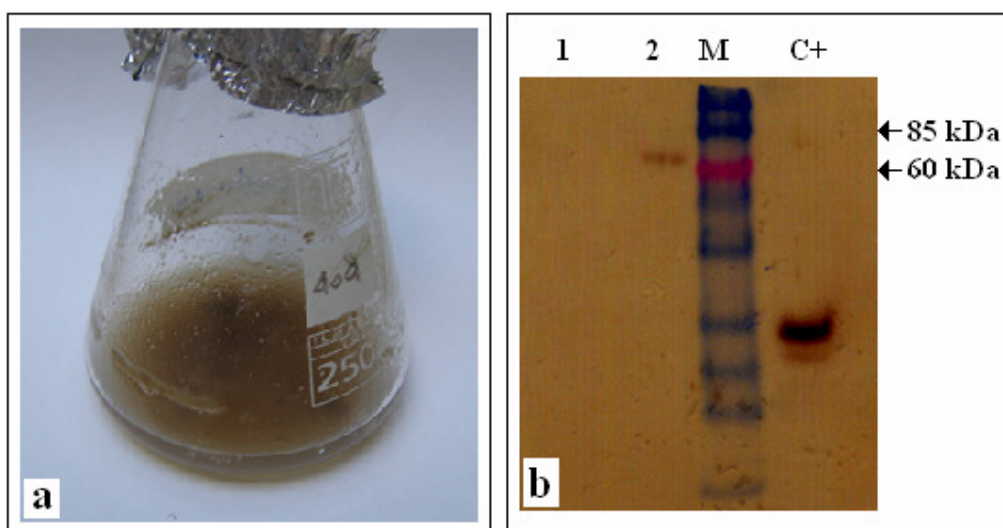




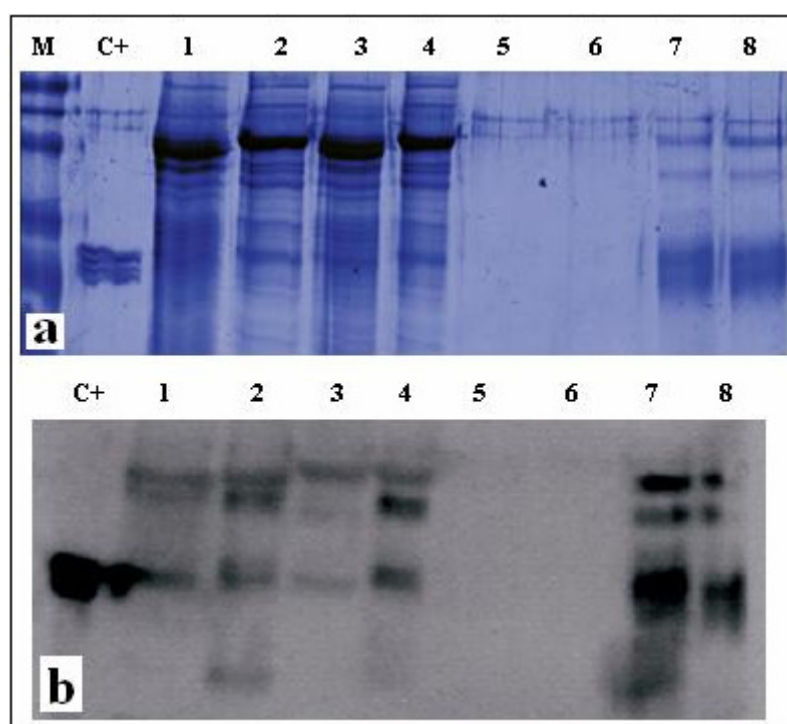
**Figura 3.22:** Analisi western delle proteine totali solubili estratte da pianta Ap15-2. *Legenda:* C-, proteine totali isolate da tabacco non transgenico; C+, proteina purificata utilizzata come controllo positivo; M, *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (INVITROGEN); 1-3, proteine estratte da fusto (10cm, 30cm e 50cm dall'apice); 4 e 8, proteine estratte da foglia giovane; 5, da foglia adulta; 6, da foglia matura; 7, da foglia in senescenza; 9, da germoglio apicale.



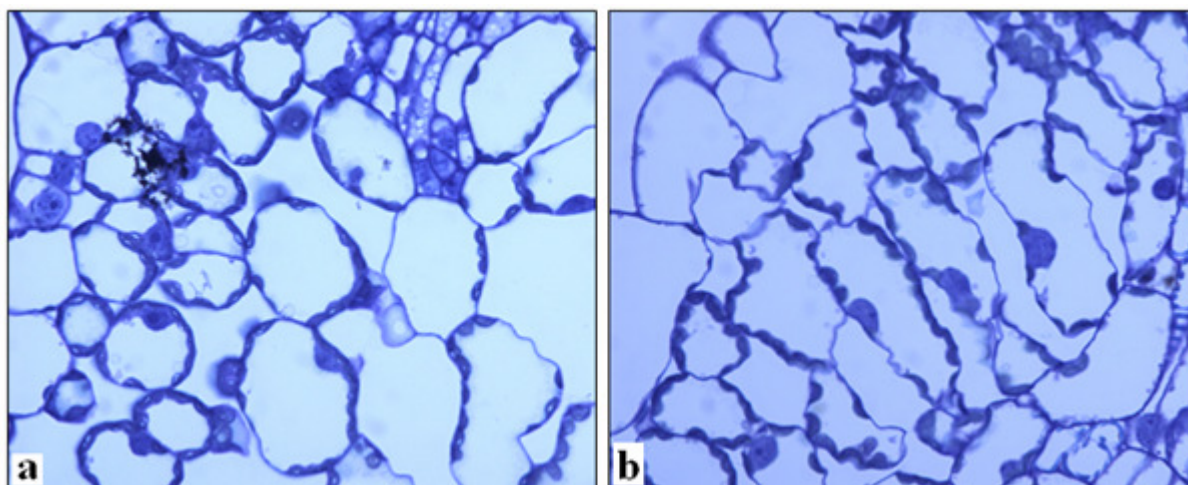
**Figura 3.23:** Analisi western della frazione idro- e lipo-solubile, e del rifiutato, delle proteine totali estratte dalla piante A15-2. *Legenda:* 1, frazione idro-solubile isolata da tabacco non transgenico; 2, frazione lipo-solubile isolata da tabacco non transgenico; 3, frazione idro-solubile isolata dalla pianta A15-2; 4, frazione idro-solubile isolata dalla pianta A15-2; 5, rifiutato di tabacco non transgenico; 6, rifiutato della pianta A15-2; C+, proteina purificata utilizzata come controllo positivo; M, *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (INVITROGEN).



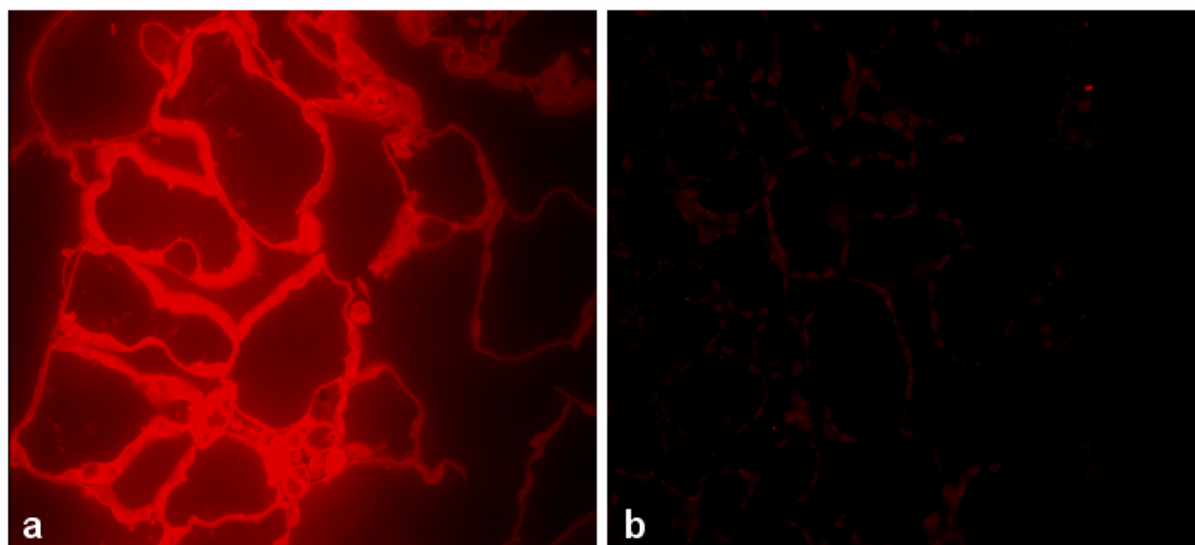
**Figura 3.24:** Coltura liquida di calli ottenuta dalla pianta Ap18-19 (a) e analisi western effettuata sulle proteine del substrato liquido. *Legenda:* 1, proteine da substrato liquido prelevato da coltura di tabacco non transgenico; 2, proteine da substrato liquido prelevato da coltura di Ap18-19; C+, proteina purificata utilizzata come controllo positivo; M, *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (INVITROGEN).



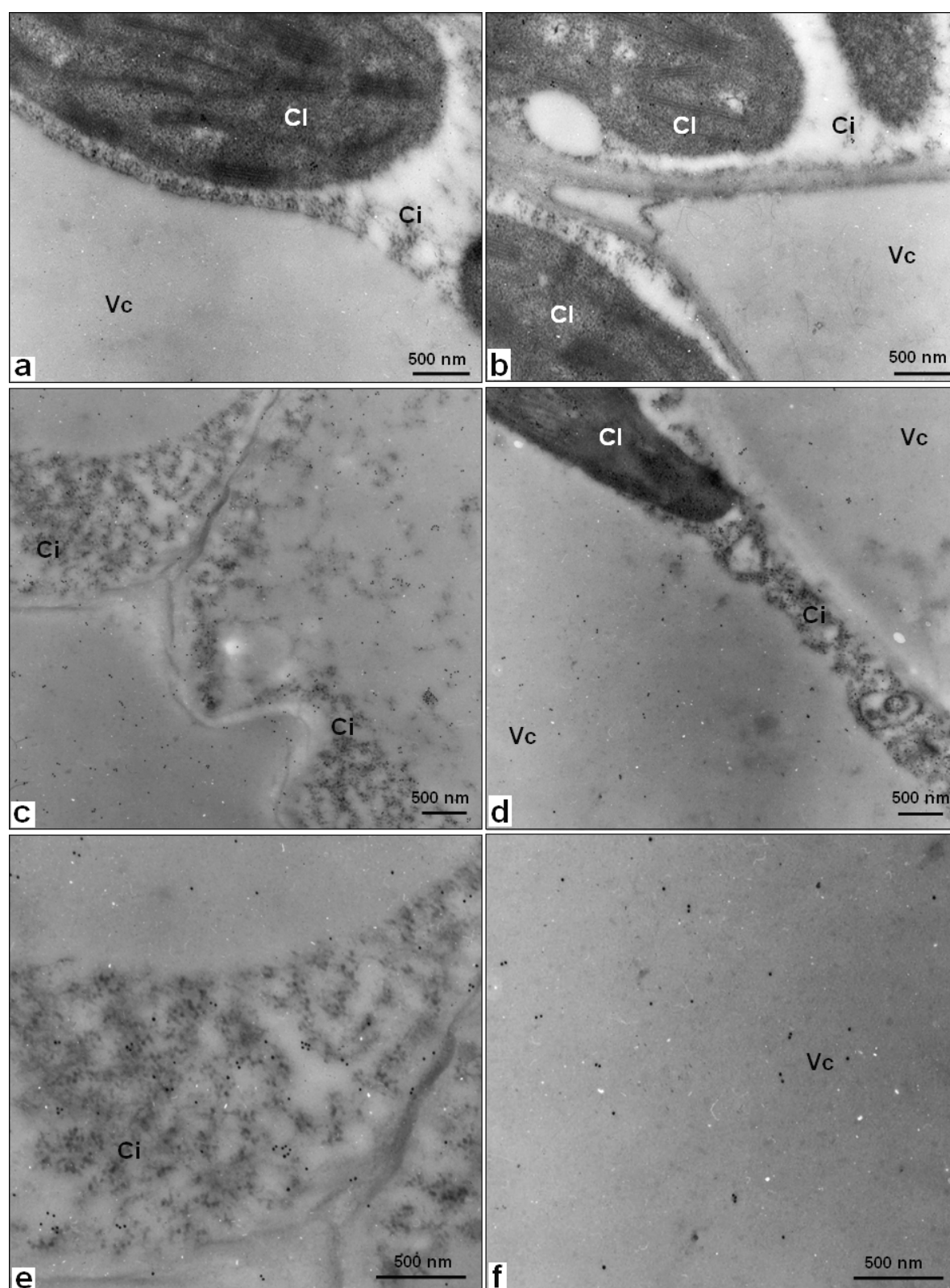
**Figura 3.25:** Coomassie (a) e Western blot (b) delle frazioni ottenute dopo purificazione della ApoA-I ricombinante da tessuto fogliare di tabacco, mediante colonna di immuno-affinità. *Legenda:* C+, proteina purificata; 1, estratto proteico da pianta non trasformata (C-) prima della cromatografia; 2, estratto proteico da pianta Ap15-2 prima della cromatografia; 3, estratto C- non legato alla resina; 4, estratto Ap15-2 non legato alla resina; 5, Eluato (frazione 2) di C-; 6, Eluato (frazione 4) di C-; 7, Eluato (frazione 4) di Ap15-2; 8, Eluato (frazione 6) di Ap15-2.



**Figura 3.26:** Particolari del tessuto lacunoso di foglia giovane di tabacco non trasformato (a) e di pianta Ap18-19.

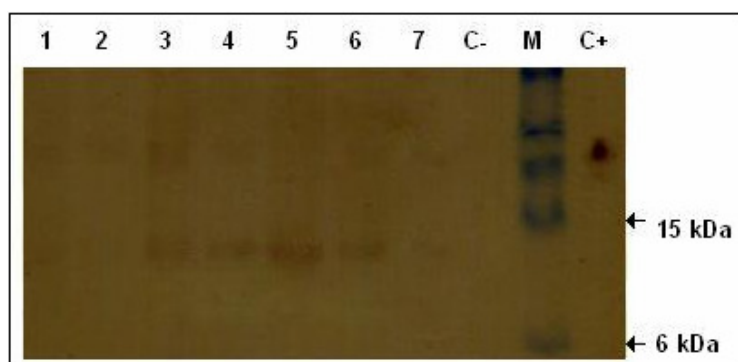


**Figura 3.27:** Particolari del tessuto lacunoso di foglia giovane di tabacco non trasformato (b), e di pianta Ap18-19 (a), osservati al microscopio a fluorescenza.

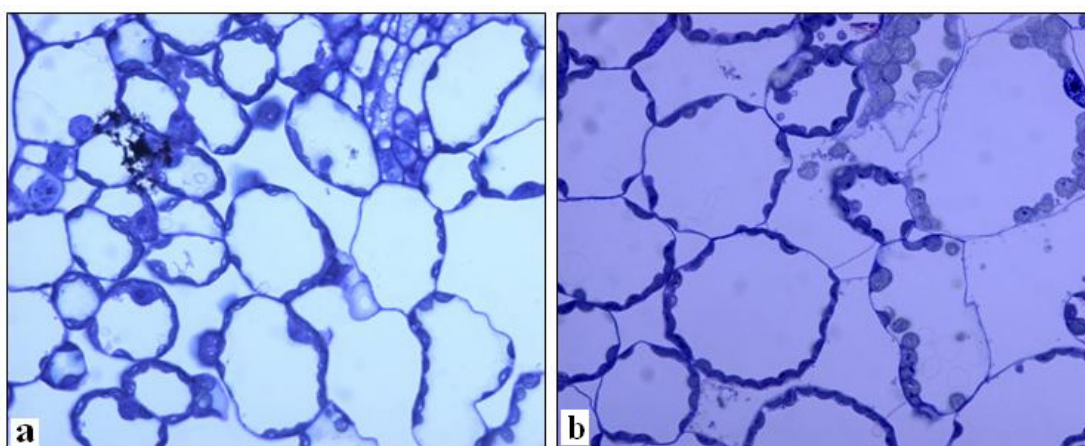


**Figura 3.28:** Cellule fogliari di tabacco non trasformato (a, b), e di pianta Ap18-19 (c, d, e, f), osservate al microscopio elettronico. Cl, cloroplasto; Ci, citoplasma; Vc, vacuolo.

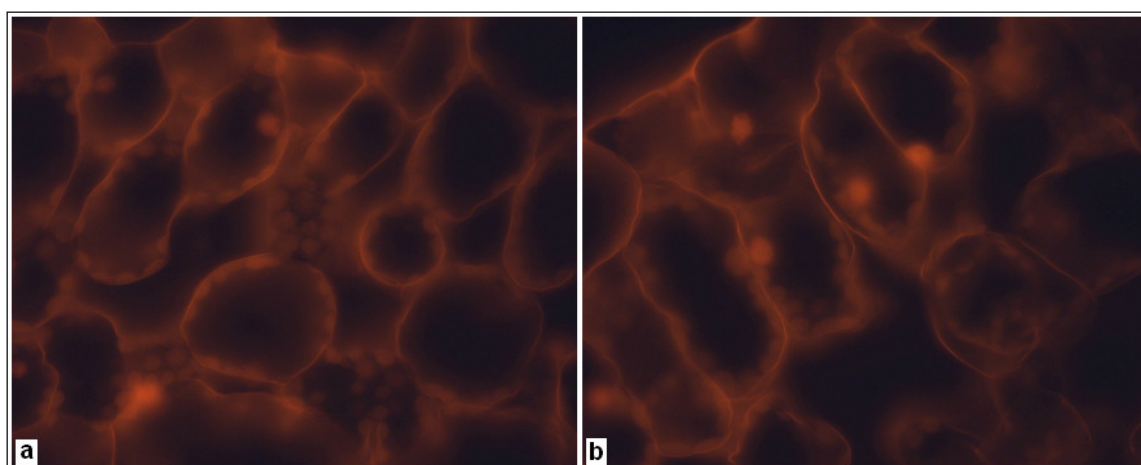




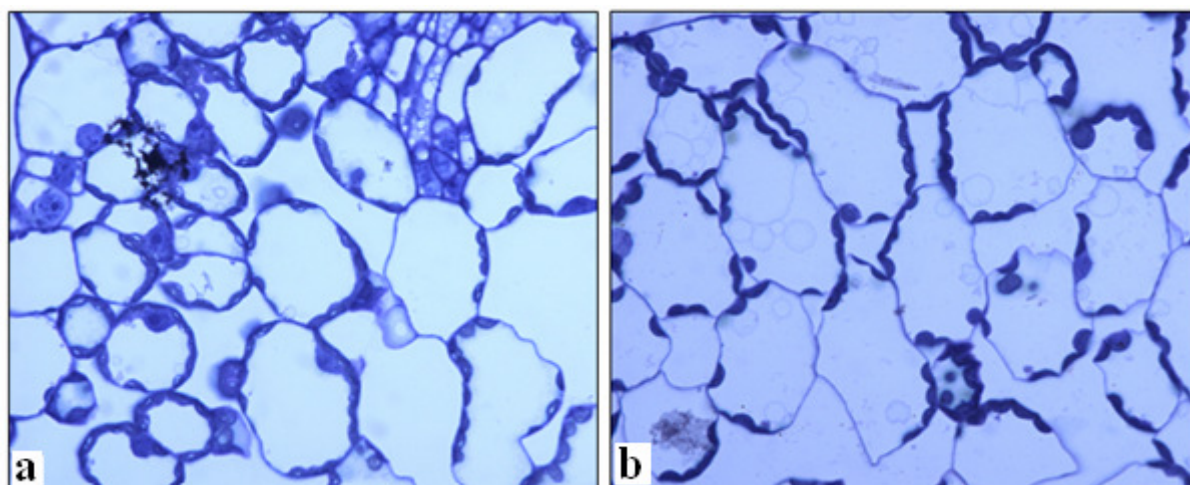
**Figura 3.29:** Analisi western delle proteine totali solubili estratte da tessuto fogliare di piante AM. *Legenda:* C-, proteine totali isolate da tabacco non transgenico; C+, proteina purificata utilizzata come controllo positivo; M, *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (INVITROGEN); 1-7, piante trasgeniche esprimenti il mutante amiloidogenico.



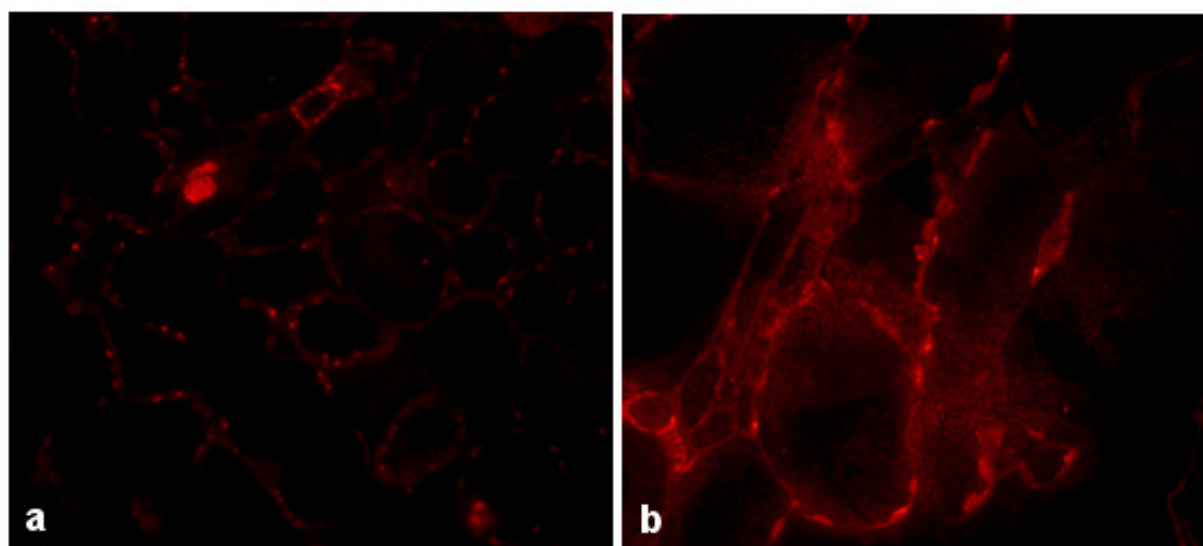
**Figura 3.30:** Particolari del tessuto lacunoso di foglia giovane di tabacco non trasformato (a) e di AM40 (c).



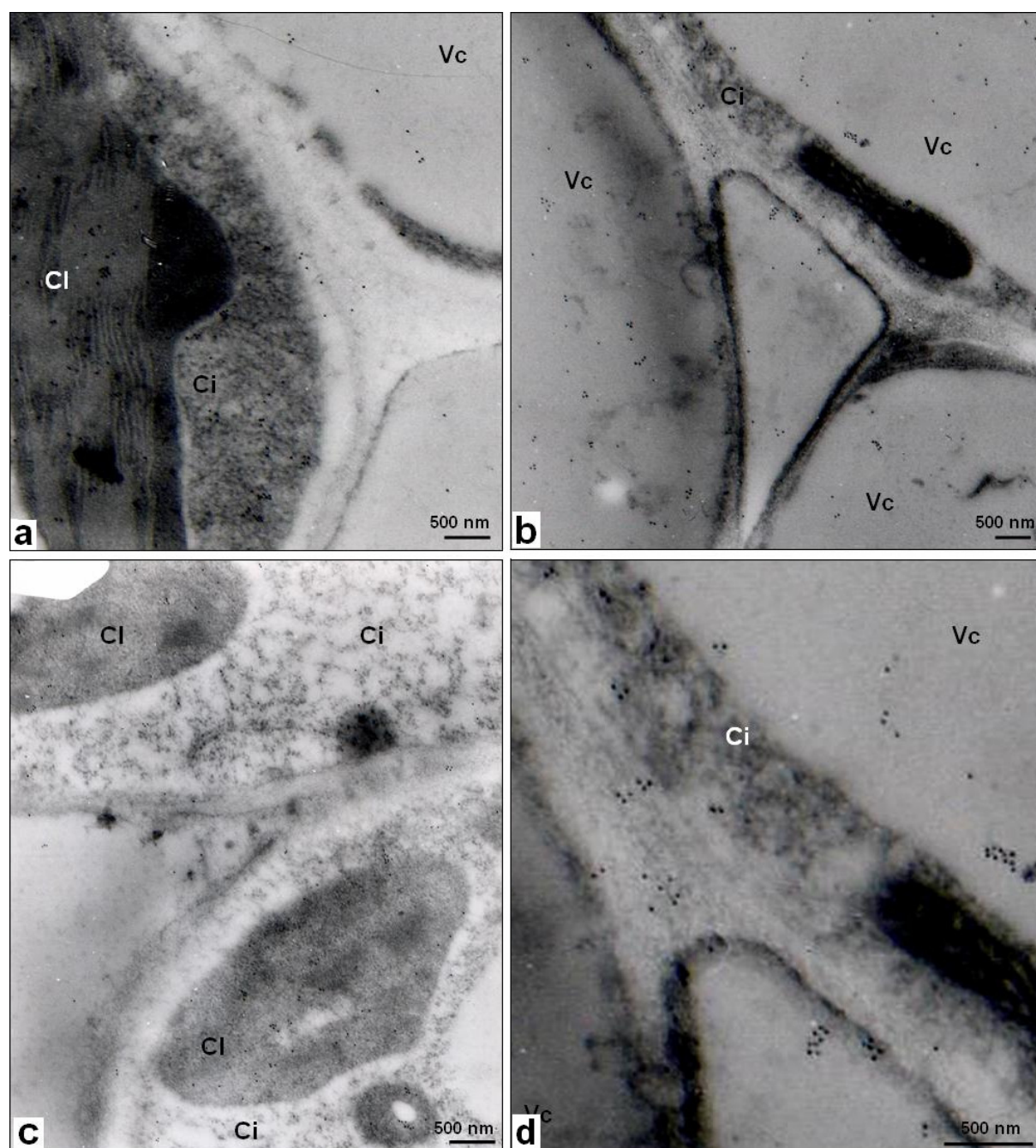
**Figura 3.31:** Particolari del tessuto lacunoso di foglia giovane di tabacco transgenico per ApoA-I(L174S) (a) e non trasformato (b).



**Figura 3.32:** Particolari del tessuto lacunoso di foglia giovane di tabacco non trasformato (a) e dalla pianta LC27 (b).

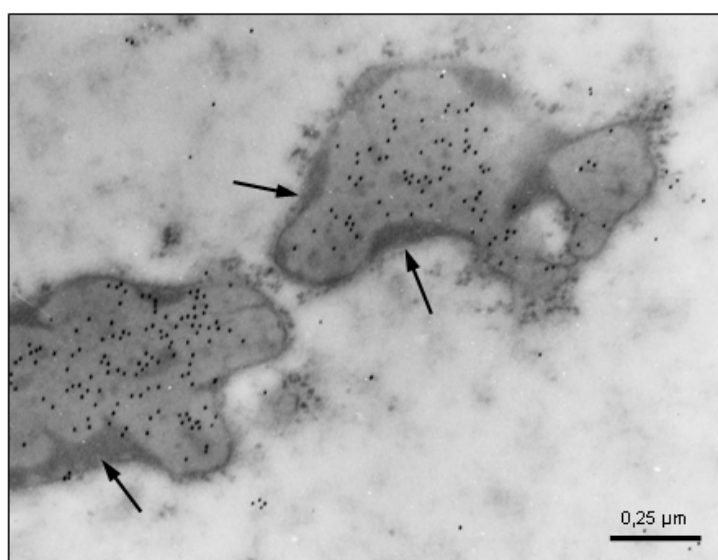


**Figura 3.33:** Particolari del tessuto lacunoso di foglia giovane di tabacco non trasformato (a) e di pianta esprimente l'enzima LCAT ricombinante (b) osservati al microscopio a fluorescenza.



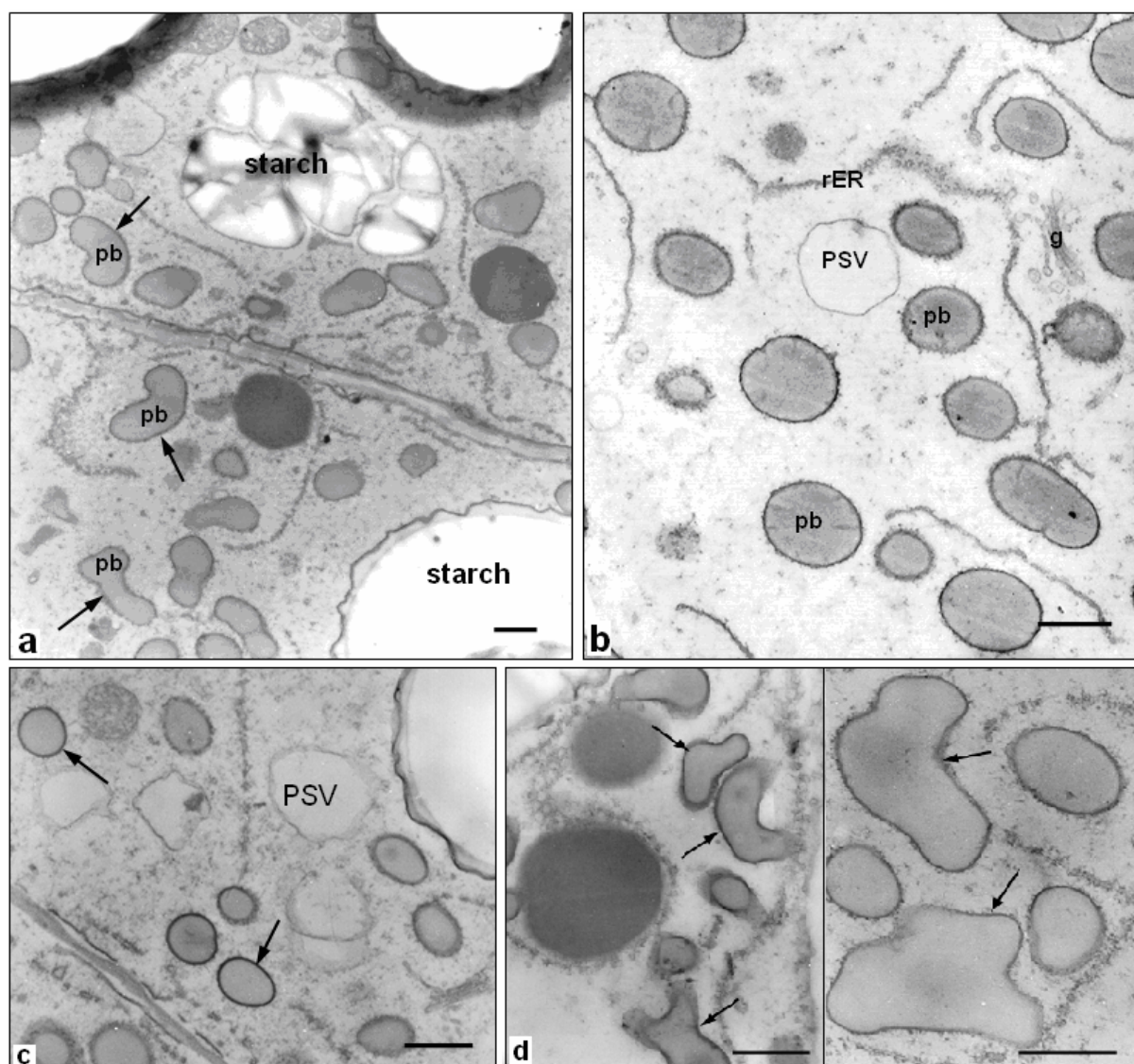
**Figura 3.34:** Cellule fogliari di tabacco trasgenico esprime l'enzima LCAT (a, b, d) e di tabacco non trasformato (c) osservate al microscopio elettronico. Legenda: Vc, Vacuolo; Ci, citoplasma; Cl, cloroplasto.



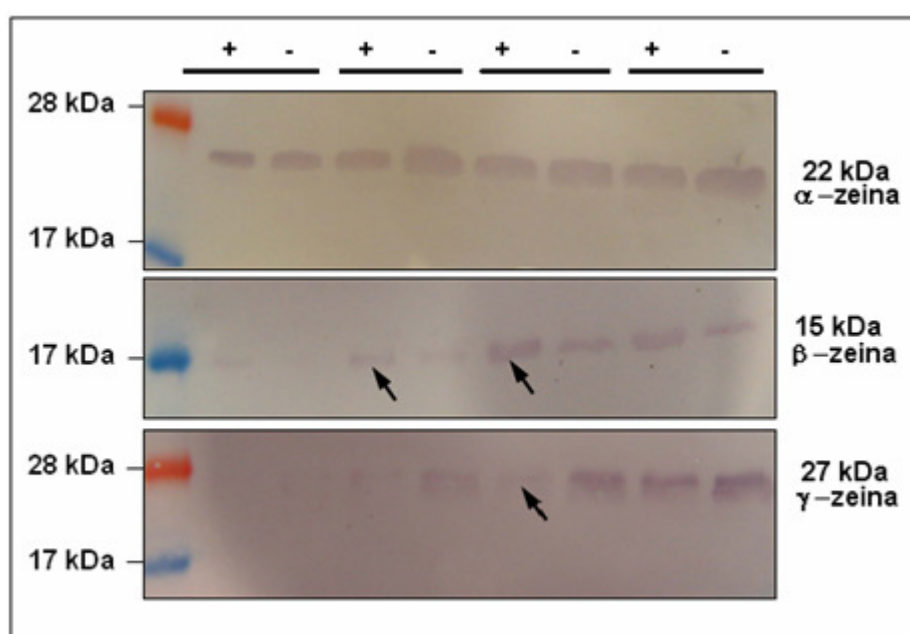


**Figura 3.35:** Immuno-localizzazione della zeolina nei corpi proteici dell'endosperma di mais trasgenico.

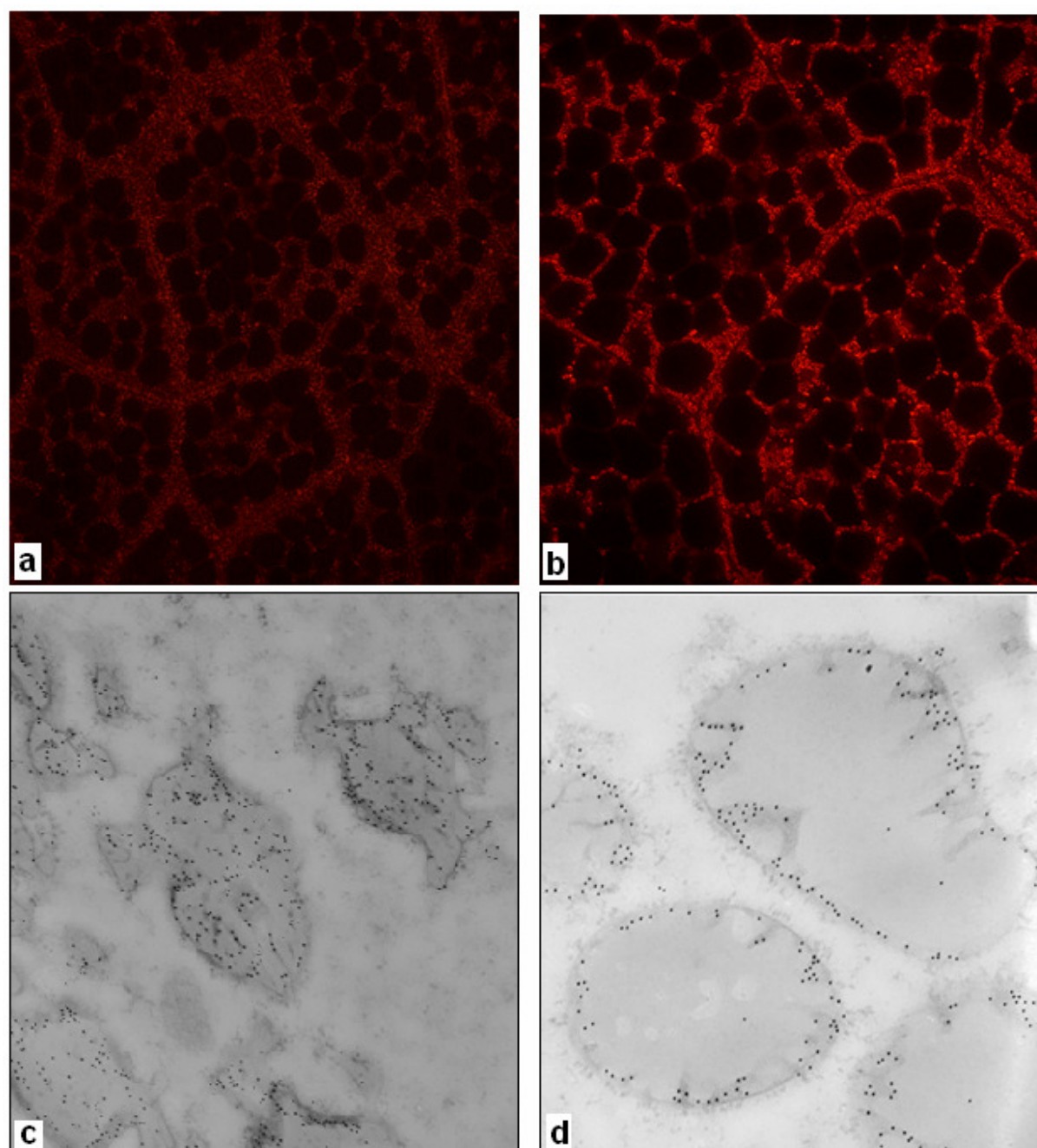




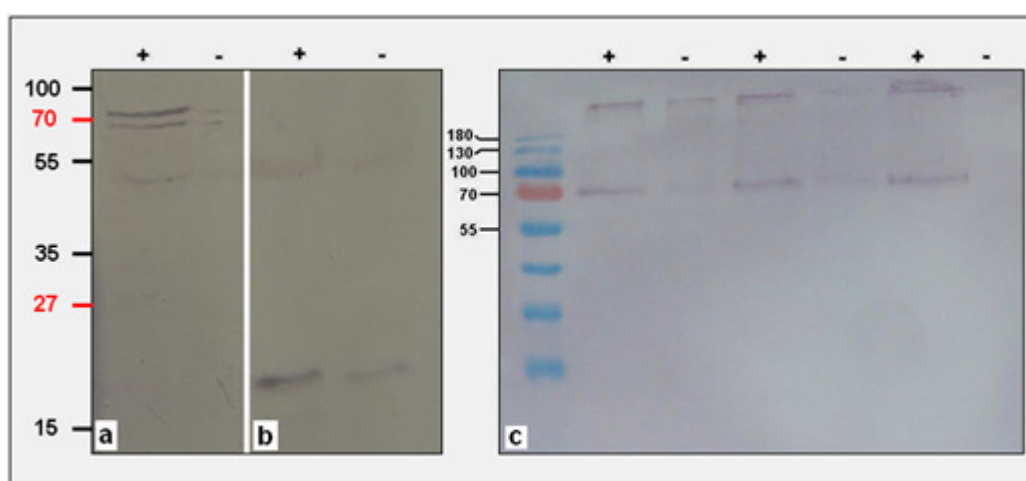
**Figura 3.36:** Endosperma di mais osservato al microscopio elettronico, di seme z+ (a) e di seme z- (b) a 16 giorni dall'impollinazione. Particolare del subaleurone (c) e dell'endosperma profondo (d) di seme z+. rER, reticolo endoplasmatico ruvido; PSV, vacuoli; g, Golgi; pb, corpi proteici. Le barre indicano 1 μm.



**Figura 3.37:** Analisi Western mediante anticorpi anti alfa-, beta- e gamma-zeina, sulle proteine solubili totali estratte da semi di mais risultati positivi (+) e negativi (-) per l'espressione della zeolina.



**Figura 3.38:** Immuno-localizzazione della 27 kDa gamma-zeina nei corpi proteici dell'endosperma di mais risultati positivi (a e c) e negativi (b e d) per l'espressione della zeolina.



**Figura 3.39:** Analisi western mediante anticorpi anti-CL1 (a), anti-CAG (b) e anti-BIP, sulle proteine solubili totali estratte da semi di mais risultati positivi (+) e negativi (-) per l'espressione della zeolina.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abdul Ajees A, Anantharamaiah GM, Vinod K Mishra, M Mahmood Hussain e HM Krishna Murthy, 2006.** Crystal structure of human apolipoprotein A-I: Insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *PNAS* 103, 7: 2126-31
- Agorogiannis EI, Agorogiannis GI, Papadimitriou A, Hadjigeorgiou GM, 2004.** Protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30: 215-24.
- Agrawal PK, Ajay Kohli, Twyman RM, Christou P, 2005.** Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Molecular Breeding* 16: 247-60.
- Al-Kaff NS, Kreike MM, Covey SN, Pitcher R, Page AM, Dale PJ, 2000.** Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nature Biotechnology* 18: 995-99.
- Ammirato PV, 1983.** Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture. Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (editori), MacMillan Publishing Co., New York: 82-123.
- Amri EZ, Vannier C, Etienne J, e Ailhaud G, 1986.** Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells. Effects of tunicamycin on activation and secretion of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 875: 334-43.
- Ando Y, Nakamura M, Kai H, Katsuragi S, Terazaki H, Nozawa T, Okuda T, Misumi S, Matsunaga N, Hata K, Tajiri T, Shoji S, Yamashita T, Haraoka K, Obayashi K, Matsumoto K, Ando M e Uchino M, 2002.** A Novel Localized Amyloidosis Associated with Lactoferrin in the Cornea. *Lab Invest* 82: 757-66.
- Andreola A, Bellotti V, Giorgetti S, Mangione P, Obici L, Stoppini M, Torres J, Monzani E, Merlini G e Sunde M, 2003.** Conformational switching and fibrillogenesis in the amyloidogenic fragment of apolipoprotein A-I. *Biol Chem* 278: 2444-51.
- Artsaenko O, Peisker M, zur Nieden U, Fiedler U, Weiler EW, Muntz K e Conrad U, 1995.** Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J*, 8: 745-750.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1987.** Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons Inc, New York*, 4.
- Banka CL, Yuan Y, De Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, 1995.** Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 36: 1058-65.
- Bardor M, Loutelier-Bourhis C, Paccalet T, Cosette P, Fitchette AC, Vezina LP, S Trépanier, M Dargis, R Lemieux, C Lange, L Faye e P Lerouge, 2003.** Monoclonal C5-1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a N-glycosylation that is homogenous and suitable for glycol-engineering into human-compatible structures. *Plant Biotechnol J*, 1: 451-62.
- Beg ZH, Stonik JA, Hoeg JM, Demosky SJ Jr, Fairwell T e Brewer HB Jr, 1989.** Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by covalent phosphorylation. *Biol Chem*, 264: 6913-21.
- Benson MD, 1995.** The metabolic basis of inheritant disease: 4159-4191.
- Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Radford SE, Blake CC, Pepys MB, 1997.** Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*, 385: 787-93.
- Booth DR, Tan SY, Booth SE, Hsuan JJ, Totty NF, Nguyen O, Hutton T, Vigushin DM, Tennent GA, Hutchinson WL, Thomson N, Soutar AK, Hawkins PN, Pepys MB, 1995.** A new apolipoprotein AI variant, Trp50Arg, causes hereditary amyloidosis. *QJM*, 88: 695-702
- Booth DR, Tan SY, Booth SE, Tennent GA, Hutchinson WL, Hsuan JJ, Totty NF, Truong O, Soutar AK, Hawkins PN, M Bruguera, J Caballería, M Solé, JM Campistol e MB Pepys, 1996.** Hereditary hepatic and systemic amyloidosis caused by a new deletion/insertion mutation in the apolipoprotein AI gene. *J Clin Invest*, 97: 2714-21.

- Boston RS, Fontes EBP, Shank BB, Wrobel RL, 1991.** Increased expression of the maize immunoglobulin binding protein homology b-70 in three zein regulatory mutants. *Plant Cell* 3: 497-05
- Bouchard M, Zurdo J, Nettleton EJ, Dobson CM, Robinson CV, 2000.** Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci*, 9: 1960–67.
- Bradford MM, 1976.** A refined and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An Biochem*, 72: 248-52.
- Breslow JL, D Ross, J McPherson, H Williams, D Kurnit, AL Nussbaum, SK Karathanasis e VI Zannis, 1982.** Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 6861–6865.
- Brewer HB Jr, T Fairwell, A LaRue, R Ronan, A Houser e TJ Bronzert, 1978.** The amino acid sequence of human apoA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 80: 623–630.
- Cascio M, Glazer PA, Wallace BA, 1989.** The secondary structure of human amyloid deposits as determined by circular dichroism spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 162: 1162–6
- Chava Kimchi-Sarfaty, JM Oh, IW Kim, ZE Sauna, AM Calcagno, SV Ambudkar e MM Gottesman, 2006.** A “Silent” Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* [DOI: 10.1126/science.1135308]
- Chawla D e JS Owen, 1995.** Secretion of active human lecithin cholesterol acyltransferase by insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Biochem. J*, 309: 249–253
- Chisholm JW, Gebre AK, Parks JS, 1999.** Characterization of C-terminal histidine-tagged human recombinant lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res.*, 40 (8):1512-1519
- Chiti FP, Webster N, Taddei A, Clark M, Stefani G, Ramponi C e M Dobson, 1999.** Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Biochemistry*, 96: 3590–94
- Chomeczynski P e Sacchi N, 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-159.
- Christou P, 1993.** Particle gun-mediated transformation. *Curr Opin Biotechnol*, 4: 135-141.
- Chu FK, Trimble RB e F Maley, 1978.** The effect of carbohydrate depletion on the properties of yeast external invertase. *J Biol Chem* 253: 8691–93.
- Chung J, Abano DA, Fless GM e Scanu AM, 1979.** Isolation, properties and mechanism of in vitro action of lecithin: cholesterol acyltransferase from human plasma. *J Biol Chem*, 254: 7456–64.
- Cluster PD, O'Dell M, Metzlauff M, Flavell RB, 1996.** Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Mol Biol*, 32:1197-203
- Cohen FE, 1999.** Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol*, 293: 313–320.
- Cohen FE e Kelly JW, 2003.** Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature*, 426: 905–909.
- Coleman CE, Clore AM, Ranch JP, Higgins R, Lopes MA e Larkins BA, 1997.** Expression of a mutant  $\alpha$ -zein creates the *floury2* phenotype in transgenic maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 7094-97
- Coleman CE, Lopes MA, Gillikin JW, Boston RS e Larkins BA, 1995.** A defective signal peptide in the maize high-lysine mutant *floury2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 6828-31
- Collet X e Fielding CJ, 1991.** Effects of inhibitors of N-linked oligosaccharide processing on the secretion, and stability of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochem*, 30: 3228–34.
- Conrad U e Fiedler U, 1998.** Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plants cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Bio*, 38: 101-9
- Conrad U, Fiedler U, Artsaenko O e Phillips J, 1998.** High-level and stable accumulation of single-chain Fv antibodies in plant storage organs. *J Plant Physiol*, 152: 708–11.



- Coriu D, Dispenzieri A, Stevens FJ, Murphy CL, Wang S, Weiss DT, Solomon A, 2003.** Hepatic amyloidosis resulting from deposition of the apolipoprotein A-I variant Leu75Pro. *Amyloid*, 10 (4): 215-23
- Cortazzo P, Cervenansky C, Marin M, Reiss C, Ehrlich R e Deana A, 2002.** Silent mutations affect *in vivo* protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Communications* 293: 537-41.
- Cramer C, Boothe JG e Oishi KK, 1999.** Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 240: 95-11.
- Cramer CL, Weissenbom DL, Oishi KK, BGrabau EA, Bennett S, Ponce E, BGrabowski GA e Radin DN, 1996.** Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann NY Acad*, 792: 62-71.
- Daizo Hamada, Itaru Yanagihara, Kouhei Tsumoto. 2004.** Engineering amyloidogenicity towards the development of nanofibrillar materials. *Trends in Biotechnology*, 22: 93-97.
- Dalmay T, Hamilton AJ, Rudd S, Angell S e Baulcombe DC, 2000.** An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-53
- Dalton MB e Swaney JB, 1993.** Structural and functional domains of apolipoprotein A-I within high density lipoproteins. *J Biol Chem*, 268: 19274-83.
- Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO, 2001.** Expression of the native colera toxin subunit gene and assembly as functionals oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Mod Biol*, 311: 1001-09.
- Dannenhoffer JM, Bostwick DE, Or E e Larkins BA, 1995.** Opaque-15, a maize mutation with properties of a defective opaque-2 modifier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1931-35
- De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A, A Depicker e G Angenon, 2002.** Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol*, 20: 1265-68.
- De Loose M, Gheysen G, Tire C, Gielen J, Villarroel R, Genetello C, Van Montagu M, Depicker A e Inze D, 1991.** The extensin signal peptide allows secretion of a heterologous protein from protoplasts. *Gene*, 99: 95-100
- de Sousa MM, Vital C, Ostler D, Fernandes R, Pouget-Abadie J, Carles D e Saraiva MJ, 2000.** Apolipoprotein AI and transthyretin as components of amyloid fibrils in a kindred with apoA1 Leu178His amyloidosis. *Am J Pathol*, 156: 1911-17
- De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R, 2003.** Transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology*, 21: 439-42
- De Wilde C, H Van Houdt, S De Buck, G Angenon, G De Jaeger e A Depicker, 2000.** Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Mol Biol*, 43: 347-359.
- Denecke J, Botterman J e R Deblaere, 1990.** Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell*, 2: 51-59
- Derek M, Dykxhoorn, Novina CD, Sharp PA, 2003.** Killing the messenger: short RNA that silence gene expression. *Mol Cell Biol*, 4: 457-467
- Dhodapkar MV, Bellotti V, Merlini G, 2000.** Amyloidosis. In Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Tilberstein LE, McGlave P, Editors. Hematology: Basic Principles and Practice, 3d edition. New York, NJ: 1416-32.
- Dieryck W, Gruber V, Baudino S, Lenée P, Pagnier J, Merot B e Poyart C, 1995.** Expression of recombinant human hemoglobin in plants. *Transfus Clin Biol*, 2: 441-447.
- Dobson CM, 1999.** Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci*, 24: 329-32.
- Doi Y e Nishida T, 1981.** Lecithin-cholesterol acyltransferase from human plasma. *Methods in Enzymology*, 71: 753-767.
- Doi Y e Nishida T, 1983.** Microheterogeneity and physical properties of human lecithin: cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 5840-5846
- Donald AM, 2005.** Self-assembly for bionanotechnology. *Materials*, 8 (5) supplemento1: 56
- Doran PM, 2000.** Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 199-04

- Dore C, Voelker TA, Herman EM e Chrispeels MJ, 1989.** Transport of proteins to the plant vacuole is not by bulk flow through the secretory system, and requires positive sorting information. *J Cell Biol*, 108: 327-37
- Drake PMW, Chargeleuge DM, Vine DM, van Dolleweerd CJ, Obregon P, Ma JKC, 2003.** Rhizosecretion of monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Mol Biol*, 52: 233-41.
- Duret L e Mouchiroud D, 2000.** Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila* and *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol*, 17: 68-74.
- Duret L e D Mouchiroud, 1999.** Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 4482-7
- Edelstein C e Scanu AM, 1980.** Effect of guanidine hydrochloride on the hydrodynamic and thermodynamic properties of human apolipoprotein A-I in solution. *J Biol Chem*, 255: 5747-54
- Edwards K, Johnstone C e Thompson C, 1991.** A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 6: 1349
- Erickson SK e Fielding PE, 1986.** Parameters of cholesterol metabolism in the human hepatoma cell line, Hep-G2. *J Lip Res*, 27: 875-883
- Fang Y, Gursky O e Atkinson D, 2003.** Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants. *Biochemistry*, 42(45): 13260-8
- Felsot AS, 2000.** Pharm Farming. *Agrichem Environ News*, 195: 1-23.
- Firek S, J Draper, MRL Owen, Gandecha A, Cockburn B e Whitelam GC, 1993.** Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Mol Biol*, 23: 861-70
- Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S, Drossard J, 1999.** Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotech Appl Biochem*, 30: 109-12
- Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, Drossard J, Sack M e Schillberg S, 1999.** Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur J Biochem*, 262: 810-16
- Fischer R, Liao YC e Drossard J, 1999.** Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *J Immunol Methods*, 226: 1-10
- Fischer R, Twyman RM e Schillberg S, 2003.** Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine*, 21: 820-825.
- Foetisch K, Westphal S, Lauer I, Retzek M, Altmann F, Kolarich D, Scheurer S e Vieths S, 2003.** Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*, 111: 889-96.
- Fontes EBP, Shank BB, Wrobel RL, Moose SP, OBrian GR, Wurtrel ET e Boston RS, 1991.** Characterization of an immunoglobulin binding protein in the maize floury endosperm mutant. *Plant Cell*, 3: 483-496.
- Francisco JA, SL Gawlak, M Miller, J Bathe, D Russell, D Chace, B Mixan, L Zhao, HP Fell e CB Siegall, 1997.** Expression and characterization of bryodin 1 and a bryodin 1-based single-chain immunotoxin from tobacco cell culture. *Bioconjug Chem*, 8: 708-13
- Francone O, L Evangelista e CJ Fielding, 1993.** Lecithin-cholesterol acyltransferase: effects of mutagenesis at N-linked oligosaccharide attachment sites on acylacceptor specificity. *Biochim Biophys Acta*, 1166: 301-304.
- Franklin SE e Mayfield SP, 2004.** Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 1-7.
- Fu XD, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A, 2000.** Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9:11-19
- Geetha KB, Lending CR, Lopes MA, Wallace JC e Larkins BA, 1991.** Opaque-2 modifiers increase  $\gamma$ -zein synthesis and alter its spatial distribution in maize endosperm. *Plant Cell*, 3: 1207-19



- Geli MI, Torrent M e Ludevid D, 1994.** Two structural domains mediate two sequential events in  $\gamma$ -zein targeting: Protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation. *Plant Cell*, 6: 1911–22.
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A, 2000.** Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotech*, 18: 1151–55
- Giddings G, 2001.** Transgenic plants as protein factories. *Curr Opinion Biotech*, 12: 450–54
- Glomset JA, Assmann EG, Gjone E e Norum KR, 1995.** Lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. In “*The metabolic and molecular bases of inherited disease*”. CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly e D Valle (Eds), 1933–51.
- Goddijn OJM e Pen J, 1995.** Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol*, 13: 379–387
- Gomord V e Faye L, 2004.** Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 171–81
- Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R e Faye L, 2005.** Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol*, 23: 559–65.
- Goodwin J, Chapman K, Swaney S, Parks TD, Wernsman EA e Dougherty WG, 1996.** Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8: 95–105
- Gordon D e Rifkind BM, 1989.** High density lipoproteins: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*, 321: 1311–15
- Gregersen N, Bolund L e Bross P, 2003.** Protein misfolding, aggregation, and degradation in disease. *Methods Mol Biol*; 232: 3–16.
- Guerineau F e Mullineaux P, 1993.** Genes and vectors. In: Croy RRD, ed. *Plant molecular biology LABFAX manual*. Oxford, Bios Scientific Publishers and Blackwell Scientific Publications, 121–147.
- Gutman G e Hatfield GW, 1989.** Nonrandom Utilization of Codon Pairs in *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 86:3699–03
- Halling Sorensen B, Nors Nielsen S., Lanzky P. F., Inger Slev F., Horten Lutzhoft H. C., Jorgens S. E. 1998.** Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere*, 36: 357–394.
- Hamamoto H, Sugiyama Y, Nakagawa N, Hashida E, Matsunaga Y, Takemoto S, Watanabe Y e Okada Y, 1993.** A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systematic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *Bio/Technology*, 11: 930–932.
- Hamidi AK, Liepnieks JJ, Nakamura M, Parker F e Benson M, 1999.** A novel apolipoprotein A1 variant, Arg173Pro, associated with cardiac and cutaneous amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 257: 584–88
- Hatfield GW e DA Roth, 2007.** Optimizing Scale up Yield for Protein Production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering. *Biotechnology Annual Review*. Edited by: M Raafat El-Gewely. Published by Elsevier
- Hatfield GW e Gutman GA, 1993.** Codon Pair Utilization Bias in Bacteria, Yeast and Mammals. In *Transfer RNA in Protein Synthesis* (Edited by DL Hatfield, BJ Lee e RM Pirtle). Published by CRC Press, Boca Raton, FL
- Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, 1980.** Lipoproteins and lipid transport. *Metabolic Control and Disease*, VIII edizione. Philadelphia: 393–494.
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H, 2000.** A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends Plant Sci*, 5: 446–51.
- Hiatt A, Cafferkey R e Bowdish K, 1989.** Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342: 76–78
- Hickman S, Kulczycki A Jr, Lynch RG e Kornfeld S, 1977.** Studies of the mechanism of tunicamycin inhibition of IgA and IgE secretion by plasma cells. *J Biol Chem*, 252: 4402–8
- Hill JS, K O, X Wang, S Paranjape, D Dimitrijevič, AG Lacko e PH Pritchard, 1993.** Expression and characterization of recombinant human lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res*, 34: 1245–1251
- Hobbs SLA, Warketing TD, DeLong CMO, 1993.** Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.*, 21: 17–26.

- Hoeg JM, Meng MS, Ronan R, Fairwell T, Brewer HB Jr, 1986.** Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by fatty acid acylation. *J Biol Chem*, 261: 3911-4.
- Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman SH, Haudenschild CC, Vaisman BL, Hoyt RF, Demosky SJ, Kauffman RD, Hazel CM, Marcovina SM e Brewer HB, 1996.** Overexpression of Lecithin:Cholesterol Acyltransferase in Transgenic Rabbits Prevents Diet-Induced Atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci USA*, 93 (21): 11448-53
- Hood EE e Jilka JM, 1999.** Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr Op Biotech*, 10: 382-386.
- Hood EE, Kusnadi A, Nikolov Z e Howard JA, 1999.** Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. *Adv Exp Med Biol*, 464: 127-47.
- Hood EE, Woodard SL e Horn ME, 2002.** Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants: myths and realities. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 630-35
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT, 1985.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.
- Hunter BG, Beatty MK, Singletary GW, Hamaker BR, Dilkes BP, Larkins BA, Jung R, 2002.** Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression. *Plant Cell*, 14: 2591-612
- Irwin B, Heck J, Hatfield GW, 1995.** Codon Pair Utilization Biases Influence Translational Elongation Step Times. *J Biol Chem*, 270: 22801-6
- Isacchi A, Sarmientos P, Lorenzetti R, Soria M, 1989.** Mature apolipoprotein A-I and its precursor proapoA-I: influence of the sequence at the 5' end of the gene on the efficiency of expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 81: 129-37
- Iturriaga G, Jefferson RA e Bevan MW, 1989.** Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 1: 381-90
- James EA, C Wang, Z Wang, R Reeves, JH Shin, NS Magnuson e JM Lee, 1997.** Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr Purif*, 19: 131-8
- Jin LH, YP Lee e A Jonas, 1997.** Biochemical and biophysical characterization of human recombinant lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res*, 38: 1085-93
- Jonas A, Sweeny SA e Herbert PN, 1984.** Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin:cholesterol acyltransferase, 459: 6369-6375.
- Jonas A, 1998** Regulation of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *Prog Lipid Res*, 37: 209-34
- Jones HD, 2005.** Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J Cereal Science*, 41: 137-47
- Jones LA, Harding JA, Cohen AS e Skinner M, 1990.** New USA family has apolipoproteinAI (Arg26) variant. *Amyloid and Amyloidosis*. Edited by JB Natvig, O Forre, G Husby, A Husebekk, B Skøgen, K Sletten e P Westermark. Boston/London, Kluwer Academic Publishers, 385-8
- Kaeppeler SM, Kaeppeler HF, Youg Rhee, 2000.** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43: 179-188.
- Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL, 2001.** Is Congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem*, 276: 22715-21
- Kilby NJ, Leyser HMO e Furner IJ, 1992.** Promoter methylation and progressive transgene inactivation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 20: 103-112
- Kim HS, JW Euym, MS Kim, BC Lee, IM Jung, JH Jeon e H Joung, 2003.** Expression of Human beta-amyloid peptide in transgenic potato. *Plant Science*, 165: 1445-51
- Kim CS, Gibbon BC, Gillikin JW, Larkins BA, Boston RS e Jung R, 2006.** The maize Mucronate mutation is a deletion in the 16-kDa gamma-zein gene that induces the unfolded protein response. *Plant J*, 48(3):440-51
- Kim CS, Hunter BG, Kraft J, Boston RS, Yans S, Jung R e Larkins BA, 2004.** A Defective Signal Peptide in a 19-kD alfa-Zein Protein Causes the Unfolded Protein Response and an Opaque Endosperm Phenotype in the Maize *De-B30* Mutant. *Plant Physiol*, 134:380-7
- Kim CS, Woo Y-M, Clore AM, Burnett RJ, Carneiro NP, Larkins BA, 2002.** Zein protein interactions, rather than the asymmetric distribution of zein mRNAs on endoplasmic

- reticulum membranes, influence protein body formation in maize endosperm. *Plant Cell*, 14: 655-72
- Kittle JD, 2006.** Radical Changes in the Engineering of Synthetic Genes for Protein Expression. *BioPharm International*, 2006: 12-8
- Klee H, Horsch R e Rogers S, 1987.** *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann Rev Plant Physiol*, 38: 467-86
- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E e Christou P, 2003** Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology*, 52: 247–58
- Kooter JM, Matzke MA, Meyer P, 1999.** Listening to the silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci*, 4: 340-6
- Kosman J e Jonas A, 2001.** Deletion of Specific Glycan Chains Affects Differentially the Stability, Local Structures, and Activity of Lecithin-cholesterol Acyltransferase. *J biol chem.*, 276(40): 37230-6
- Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assman G e Kastelein J, 1997.** The molecular pathology of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes, 38: 191-205.
- Kumpatla SP e Hall TC, 1998.** Recurrent onset of epigenetic silencing in rice harboring a multi-copy transgene. *Plant J*, 14: 129–135.
- Kwon TH, JE Seo, J Kim, JH Lee, YS Jang, MS Yang, 2003.** Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnol Bioeng*, 81: 870–5
- Kwon TH, Kim YS, Lee JH e Yang MS, 2003.** Production and secretion of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic tomato suspension cultures. *Biotechnol Lett*, 25: 1571–4
- Lacko AG, Reason AJ, Nuckolls C, Kudchodkar BJ, Nair MP, Sundarrajan G, Pritchard PH, Morris HR, Dell A, 1998.** Characterization of recombinant human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT): N-linked carbohydrate structures and catalytic properties. *J Lipid Res*, 39(4): 807-20
- LaCount W, An G e Lee JM, 1997.** The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures. *Biotech Lett*, 19: 93–6
- Larrick JW, Yu L, Naftzger C, Jaiswal S, Wycoff K, 2001.** Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomol Eng*, 18: 87-94.
- Larrick JW e DW Thomas, 2001.** Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotech*, 12(4): 411-8
- Lee DH, 1998.** Characterization of 27K zein as a transmembrane protein. *J Biochem Mol Biol*, 31: 196–200.
- Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Jang YS e Yang MS, 2002.** Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *J Biotechnol*, 96: 205–11
- Lee SY e Kim DI, 2002.** Stimulation of murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by pluronic F-68 and polyethylene glycol in transgenic *Nicotiana tabacum* cell culture. *Biotechnol Lett*, 24: 1779–83
- Lending CR e Larkins BA, 1989.** A model for protein body formation in corn: immunolocalization of zeins in developing maize endosperm by light and electron microscopy. *Plant Cell*, 1: 1011-23
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fitchette-Lainé AC, Gomord V e Faye L, 1998.** N-Glycoprotein biosynthesis in plants. Recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology*, 38:, 31-48
- Li Z, Wang L, Yang G, Shi H, Jiang C, Liu W e Zhang Y, 2003.** Study on the Determination of Polyphenols in Tobacco by HPLC Coupled with ESI-MS After Solid-Phase Extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 41 (1): 36-40
- Lima VLM, DS Harry, N McIntyre, JS Owen e MEC Chaves, 1996.** Characterization and potential uses of rabbit polyclonal antibodies against human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 957–68

- Lima VLM, Coelho LCB, Kennedy JF, Owen JS e Dolphin PJ, 2004.** Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) as a plasma glycoprotein: an overview. *Carbohydr Polymers*, 55 (2): 179-91
- Lima VLM, 1989.** Polyclonal antibodies to human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase. *PhD thesis*. University of London.
- Lima VLM, Harry DS, Owen JS e McIntyre N, 1987.** Polyclonal antibodies to human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemical Society Transactions*, 15: 477-8
- Lima VLM, McIntyre N e Owen JS, 1988a.** Secretion of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) by the human hepatoma cell line, HepG-2. *Biochem Soc Transactions*, 16: 155-6
- Lima VLM, McIntyre N e Owen JS, 1988b.** Secretion of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) by cultured human hepatoblastoma cell lines. *Journal of Hepatology*, 7: S52
- Limanton-Grevet A e Jullien M, 2001.** Agrobacterium-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L: molecular and genetic analysis of transgenic plants. *Mol Breed*, 7: 141-50
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM e Dougherty WG, 1993.** Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-59
- Liu A, RM Lawn, JG Verstuyft e EM Rubin, 1994.** Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein[a] in transgenic mice. *J Lipid Res*, 35: 2263-7
- Loc TN, Tinjuangjun P, Gatehouse MRA, Christou P, Gatehouse AJ, 2002.** Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Mol Breed*, 9: 231-44
- Lopes MA, Takasaki K, Bostwick DE, Helentjaris T e Larkins BA, 1995.** Identification of two opaque2 modifier loci in quality protein maize. *Mol Gen Genet*, 247: 603-13
- Lurquin PF e Filippone E, 1989.** Stable transformation of eggplant (*Solanum melanongena* L) by co-cultivation of tissue with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid vector. *Plant Cell Reports*, 8: 370-373
- Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K e Lehner T, 1995.** Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 268: 716-9
- Ma ShengWu, Huang Yan, Davis A, Yin ZiQin, Mi QS, Menassa R, Brandle JE, Jevnikar AM, 2005.** Production of biologically active human interleukin-4 in transgenic tobacco and potato. *Plant Biotechnology Journal*, 3 (3): 309-318
- Magnuson NS, Linzmaier PM, Gao JW, Reeves R, An G, Lee JM, 1996.** Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Protein Expr Purif*, 7: 220-8
- Magnuson NS, PM Linzmaier, R Reeves, G An, K HayGlass e JM Lee, 1998.** Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr Purif*, 13: 45-52
- Mainieri D, Rossi M, Archinti M, Bellocci M, De Marchis F, Valvassori S, Pompa A, Arcioni S e Vitale A, 2004.** Zeolin. A New Recombinant Storage Protein Constructed Using Maize gamma-Zein and Bean Phaseolin. *Plant Physiology*, 136: 3447-56
- Maliga P, 2002.** Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Op Plant Biol*, 5: 164-72.
- Maliga P. 2003.** Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Plant Sci*, 21: 20-8
- Malloty JB, Kushner PJ, Protter AA, CL Cofer, VL Appleby, K Lau, JW Schilling e JL Vigne, 1987.** Expression and characterization of human apolipoprotein A-I in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 262: 4241-7
- Matsumoto S, Ikura K, Ueda M e Sasaki R, 1995.** Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol*, 27: 1163-72.
- Matsumoto S, Ishii A, Ikura K, Ueda M e Sasaki R, 2003.** Expression of human erythropoietin in cultured tobacco cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57: 1249-52

- Matzke AJM e Matzke MA, 1998.** Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 142–148.
- Mayfield SP, Franklin SE e Lerner RA, 2003.** Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 438-42
- Mayfield PS e Scott E. Franklin, 2005.** Expression of human antibodies in eukaryotic microalgae. *Vaccine* 23 (15): 1828-1832; 27, 44).
- McGrath P, 2002.** Molecular farming – tobacco’s future? *Tobacco J Int* 9/10: 41-4.
- McLean J, Fielding C, Drayna D, Dieplinger H, Baer B, Kohr W, Henzel W e Lawn R, 1986.** Cloning and expression of human lecithin: cholesterol acyltransferase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83: 2335–2339
- Merlini G. 1995.** Treatment of primary amyloidosis. *Sem Hemato*, 32: 60-79
- Miller JH, 1972.** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Miller KR, JC Wang, M Sorci-Thomas, RA Anderson e JS Parks, 1996.** Glycosylation structure and enzyme activity of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma, hepG2 cells, and baculoviral and Chinese hamster ovary cell expression systems. *J Lipid Res*, 37: 551–61
- Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Muratami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y, Ohashi Y, 1996.** Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol*, 37: 43-59
- Miyazaki A, S Sakuma, W Morikawa, T Takiue, F Miake, T Terano, M Sakai, H Hakamata, YI Sakamoto, M Naito, Y Ruan, K Takahashi, T Ohta, S Horiuchi, 1995.** Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 1882-8
- Moffatt BA e Studier FW, 1986.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189: 113-30
- Moguilewsky N, Robool C, Loriau R, Guillaume JP, Jacobs P, Cravador A, Herzog A, Brouwers L, Scarso A, Gilles P, LA Carlson e A Bollen, 1987.** Production of human recombinant proapolipoprotein A-I in *Escherichia coli*. *DNA*, 8: 429-36
- Montreuil J, Bouquelet S, Debray H, Lemoine J, Michalski JC, Spik G e Strecker G, 1994.** Glycoproteins. In MF Chaplin e JF Kennedy (Eds), *Carbohydrate analysis: A practical approach*, 181–293. Oxford: IRL Press
- Morgan DM, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW, 2000.** A beta peptide vaccination prevents memory loss in animal model of Alzheimer disease. *Nature*, 408: 982-985
- Moro GL, Lopes MA, Habben JE, Hamaker BR e Larkins BA, 1995.** Phenotypic effects of opaque2 modifier genes in normal maize endosperm. *Cereal Chem*, 72: 94–99
- Muchowski PJ, 2002.** Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones. *Neuron*, 35: 9–12
- Murashige T e Skoog F, 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 475-79
- Murphy CL, Shuching W, Weaver K, Gertz MA, Weiss DT e Solomon A, 2004.** Renal Apolipoprotein A-I amyloidosis associated with a novel mutant Leu64Pro. *American journal of kidney diseases*, 44 (6): 1103-9
- Nagel RJ, Manners JM, Birch RG, 1992.** Evaluation of an Elisa assay for rapid detection and quantification of neomycin phosphotransferase II in transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10: 263-272.
- Nanjee MN, Crouse JR, King JM, Hovorka R, Rees SE, Carson ER, Morgenthaler J, Lerch P, Miller NE, 1996.** Effects of intravenous infusion of lipid-free Apo A-I in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 16: 1203-1214.
- Nanjee MN, Doran JE, Lerch PG, Miller NE, 1999.** Acute effects of intravenous infusion of apoA1/Phosphatidylcholine discs on plasma lipoproteins in human. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 979-89

- Neuhuber F, Park Y-D, Matzke AJM e Matke MA, 1994.** Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. *Mol Gen Genet*, 244: 230–241
- Nilsson MR e Dobson CM, 2003.** *In vitro* characterization of lactoferrin aggregation and amyloid formation. *Biochemistry*, 42: 375–82
- Noiriel A, Benveniste P, Banas A, Stymne S, Bouvier-Navé P, 2004.** Expression in yeast of a novel phospholipase A1 cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 271: 3752–64
- Norum KR e Gjone E, 1967.** Familial serum-cholesterol esterification failure. A new inborn error of metabolism. *Biochim Biophys Acta.*, 5; 144(3): 698–700
- Nuttall J, Vine N, Hadlington JL, Drake P, Frigerio L, Ma JKC, 2002.** ER-resident chaperone interaction with recombinant antibodies in transgenic plants. *Eur J Biochem*, 269: 6042–51
- O K, JS Hill, X Wang, R McLeod e PH Pritchard. 1993.** Lecithin:cholesterol acyltransferase: role of N-linked glycosylation on the enzyme function. *Biochem J*, 294: 879–84
- Obici L, Bellotti V, Mangione P, Stoppini M, Arbustini E, Verga L, Zorzoli I, Anesi E, Zanotti G, Campana C, Vigano M, Merlini G, 1999.** The new apolipoprotein A-I variant Leu 174-Ser causes hereditary cardiac amyloidosis, and the amyloid fibrils are constituted by the 93-residue N-terminal polypeptide. *American J Pathology*, 155: 695–02
- Olhoft PM e Phillips RL, 1999.** Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. In: H.R. Lerner (Ed.) *Plant Responses to Environmental Stressed: From Phytohormones to Genome Reorganization*, Marcel Dekker, NY: 111–48
- Ooms G, Hooykaas PJJ, Van Veen RJM, Van Beelen P, Regensburg-Tunik R e Schilperoort RA, 1982.** Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7: 15–9
- Padidam M, 2003.** Chemically regulated gene expression in plants. *Curr Op Plant Biotechnol*, 6: 169–77
- Pepys MB, Booth DR, Hutchinson WL, Gallimore JR, Collins PM, Hohenester E, 1997.** Amyloid P component. A critical review. *Amyloid Int J Exp Clin Invest*, 4: 274–95
- Persey MR, Booth DR, Booth SE, vanZyl-Smit R, Adams BK, Fattaar AB, Tennent GA, Hawkins PN e Pepys MB, 1998.** Hereditary nephropathic systemic amyloidosis caused by a novel variant apolipoprotein A-I. *Kidney Int*, 53: 276–81
- Philippe G. Frank e Yves L. Marcel, 2000.** Apolipoprotein A-I: structure;–function relationships. *Journal of Lipid Research*, 41: 853–72
- Pickford AS e Cogoni C, 2003.** RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol Life Sci* 60: 871–82
- Porat Y, Abramowitz A e Gazit E, 2006.** Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chem Biol Drug Des*, 67: 27–37.
- Qin Yao, Ling Cong, JL Chang, KX Li, GX Yang e GY He, 2006.** Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*, 57 (14): 3737–46
- Que Q, Wang H-Y, English JJ and Jorgensen RA (1997)** The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* 9: 1357–68
- Ramirez N, Lorenzo, D Palenzuela, L Herrera, M Ayala, A Fuentes, M Pérez, J Gavalondo e P Oramas, 2000.** Single-chain antibody fragments specific to the hepatitis B surface antigen, produced in recombinant tobacco cell cultures. *Biotech Lett*, 22: 1233–6
- Reches M e Gazit E, 2003.** Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science*, 300(5619): 625–7
- Regge T, 2002.** Dal tabacco una speranza per il Terzo mondo. *La Repubblica* 28/9/2002.
- Reinhold P Linke, 2000.** Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. 436 (5): 439–48
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS, 2000.** Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology*, 18: 1167–71

- Romano A, Raemakers K, Bernardi J, Visser R, Mooibroek H, 2003.** Transgenic organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgenic Research*, 12: 461–73
- Ross CA e Poirier MA, 2004.** Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Med*, 10: S10–S17
- Roterman I, Krul M, Nowak M, Konieczny L, Rybarska J, Stopa B, Piekarska B, Zemanek G, 2001.** Why Congo red binding is specific for amyloid proteins—model studies and a computer analysis approach. *Med Sci Monit*, 7: 771–84
- Ryan RO, Forte TM e Oda NM, 2002.** Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expression and Purification*, 27: 98–103
- Saalbach I, Gierberg M, Conrad U, 2001.** High-level expression of single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *J Plant Physiol*, 158: 529–33
- Sadana A e Vo-Dinh T, 2001.** Biomedical implications of protein folding and misfolding. *Biotechnol Appl Biochem*, 33: 7–16
- Sakaki Y, Yoshioka K, Tanahashi H, Furuya H e Sasaky H, 1989.** Human transthyretin (prealbumin) gene and molecular genetics of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol Biol Med*, 6: 161–8
- Salamini F, Bremenkamp M, Di Fonzo N, Manzocchi L, Marotta R, Motto M e Soave C, 1985.** Genetic regulation of zein deposition in maize. In *Molecular Form and Function of the Plant Genome*, L Vloten-Doting, GSP Groot e TC Hall (eds). NY: Plenum Press, 543–53
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schardl C, Byrd AD, Benzion G, Altschuler MA, Hildebrand DF, Hunt AG, 1987.** Design and construction of a versatile system for the expression of foreign genes in plant. *Gene*, 61: 1–11
- Scheibel T, Bloom J e Lindquist SL, 2004.** The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion. *PNAS*, 101 (8): 2287–92
- Schillberg S, Emans N, Fischer R, 2002.** Antibody molecular farming in plants cells. *Phytochem Rev*, 1: 45–54
- Schillberg S, Fischer R e Emans N, 2003.** Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci*, 60: 433–45
- Schindler PA, CA Settineri, X Collett, CJ Fielding e AL Burlingame, 1995.** Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Prot Sci*, 4: 791–803
- Schneider GB, English A, Abraham M, Zaharias R, Stanford C e Keller J, 2004.** The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials* 25 (15): 3023–28
- Scriber CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler, 2001.** The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, VIII edizione
- Sehnke PC e Ferl RJ, 1999.** Processing of preprorizin in transgenic tobacco. *Protein Expr Purif*, 15: 188–95
- Shank KJ, Su P, Brglez I, Boss WF, Dewey RE e Boston RS, 2001.** Induction of lipid metabolic enzymes during the endoplasmic reticulum stress response in plants. *Plant Physiol*, 126: 267–277
- Sharp JM e Doran PM, 2001a.** Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cell. *Biotechnol Bioeng*, 73: 338–346
- Sharp JM e Doran PM, 2001b.** Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol Progr*, 17: 979–92
- Shenk D Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P, 1999.** Immunization with amyloid beta attenuate alzheimer desaease-like pathology in PDAPP mouse. *Nature*, 400: 173–77
- Shmidt HHJ, Haas R, Remaley A, Genshel J, Strassburg C, Buttner C, Manns MP, 1997.** *In vivo* kinetics as a sensitive method for testing physiologically intact human

- recombinant apolipoprotein A-I: comparison of three different expression systems. *Clin Chim Acta*, 268: 41-60
- Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A, 1990.** Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology*, 8: 217-221.
- Sipe JD, 1992.** Amyloidosis. *Annu Rev Biochem*, 61: 947-75
- Sleat DE, Hull R, Turner PC, Wilson TM, 1987.** Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general *enhancer* of translation in vitro. *Gene*, 217: 217-25
- Sorci, Kearns MW, Lee JP, 1995.** Apolipoprotein A-I domains involved in lecithin-cholesterol acyltransferase activation. Structure: function relationships. *J Biol Chem*, 268: 211-28
- Sorci-Thomas M, Parks JS, Kearns MW, Pate GN, Zhang C, Thomas MJ, 1996.** High level secretion of wild-type and mutant forms of human proapoA-I using *Baculovirus-mediated* Sf-9 cell expression. *J Lipid Res*, 37: 673-83
- Soto C, 2001.** Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett*, 498: 204-7
- Soto C, 2003.** Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 4: 49-60
- Soutar AK, Hawkins PN, Vigushin DM, Tennent GA, Booth SE, Hutton T, Nguyen A, Totty NF, Hsuan JJ, Pepys MB, 1992.** Apolipoprotein AI mutation Arg 60 causes autosomal dominant amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 7389-93
- Sparks CA e Jones HD, 2004.** Transformation of wheat by biolistics. In *Transgenic crops of the world—essential protocols*. Curtis I, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 19-34
- Sriraman R, Bardor M, Sack M, Vaquero C, Faye L, Fischer R, Finnern R, Lerouge P, 2004.** Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core- $\alpha$ (1,3)-fucose residues. *Plant Biotech J*, 2(4): 279-87(9)
- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hardukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schilittler M, Carrol JA, Spatola L, 2000.** High-yield production of human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology*, 18: 333-8
- Steiner UP, 2000.** Assessment of economics of transgenic technologies for biologicals. Bayer Biotechnology, Bayer Corp. *Production and Economics of Biopharmaceuticals*, San Diego, CA: 13-15
- Steinmetz A e Utermann G, 1983.** Human apolipoprotein A-IV activates the enzyme Lecithin:cholesterol acyltransferase. *Art Urio sclerosis*, 3: 495a.
- Stevens VC, Chou WS, Powell JE, Lee AC e Smoot J, 1986.** The identification of peptide sequences of human chorionic gonadotropin containing a conformational epitope. *Immunol Lett*, 12: 11-8
- Stoger E, Sack M, Fischer R e Christou P, 2002.** Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 161-66
- Stoger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P e Fischer R, 2000.** Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol*, 42: 583-90
- Stokke KT, Fjeld NB, Kluge TH e Skrede S, 1974.** Lipid composition and cholesterol esterification in lymph. *Scandinavian J Clinical and Laboratory Investigation*, 33: 199-206
- Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T e Kilby NJ, 2004.** Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol Biol* 54: 157-74
- Szabo BK Hori, A Nakajima, N Sasagawa, Y Watanabe, S Ishiura, 2004.** Expression of Amyloid- $\beta$ 1-40 and 1-42. Peptides in *Capsicum annum* var *angulosum* for Oral Immunization. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2 (4): 383-88
- Takamatsu N, Watanabe Y, Yanagi H, Meshi T, Shiba T e Okada Y, 1990.** Production of enkephalin in tobacco protoplasts using mosaic virus RNA vector. *FEBS Lett*, 269: 73-76
- Tan ST e Pepys MB, 1994.** Amyloidosis. *Hystopathology*, 25: 403-14
- Tartakoff AM, 1983.** Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*, 32: 1026-28



- Thompson AJ e Barrow CJ, 2002.** Protein conformational misfolding and amyloid formation: characteristics of a new class of disorders that include Alzheimer's and prion diseases. *Curr Med Chem*, 9: 1751–62
- Tkacz JS e Lampen JO, 1975.** Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 65: 248–57
- Topfer R, Mazzeit V, Gronenborn B, Shell J, Steinbiss HH, 1987.** A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucl Acid Res*, 15: 5890-5
- Torres E, Vaquero C, Nicholson L, Sack M, Stoger E, Drossard J, Christou P, Fischer R, Perrin Y, 1999.** Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Res*, 8: 441-9
- Tramontano A, Leplae R e Morea V, 2001.** Analysis and assessment of comparative modeling predictions in CASP4. *Proteins*, 5: 22-38
- Tregoning JS, Nixon P, Huroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, Van Wijk, Dougan G, Maliga P, 2003.** Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acid Res*, 31: 1174-9
- Tremblay L, Levasseur C. e Tremblay FM, 1999.** Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany*, 86: 1373-81
- Tulenko TN e Sumner AE, 2002.** The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiology*, 9 (6): 638-49
- Uchida N, Smilowitz H e Tanzer ML, 1979.** Monovalent ionophores inhibit secretion of procollagen and fibronectin from cultured human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 1868–72
- Uversky VN, 2003.** Protein folding revisited. A polypeptide chain at the folding–misfolding–nonfolding cross-roads: which way to go? *Cell Mol Life Sci*, 60: 1852–71
- Uversky VN e Fink AL, 2004.** Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta*, 1698: 131–53
- van Blokland R, ten Lohuis M e Meyer P, 1997.** Condensation of chromatin in transcriptional regions of an inactivated plant transgene: evidence for an active role of transcription in gene silencing. *Mol Gen Genetics*, 257: 1-13
- Van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, M Villalba, S Koppelman, R Aalberse, R Rodriguez, L Faye e P Lerouge, 2000.** Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem*, 275: 11451-11458.
- Vandekerckhove J, Van Damme J, Van Lijsebettens M, Botterman J, De Block M e Krebbers E, 1989.** Enkephalines produced in transgenic plants using modified 2S storage proteins. *Bio/Technology*, 7: 929-32
- Verbelen JP e Kerstens S, 2000.** Polarization confocal microscopy and congo red fluorescence: a simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants. *Journal of Microscopy*, 198: 2, 101-7
- Vigushin DM, Gough J, Allan D, Alguacil A, Penner B, Pettigrew NM, Quinonez G, Bernstein K, Booth SE, Booth DR, Soutar AK, Hawkins PN, Pepys MB, 1994.** Familial nephropathic systemic amyloidosis caused by apolipoprotein AI variant Arg 26. *QJM*, 87:149–54
- Vitello LB e Scanu AM, 1976.** Studies on human serum high density lipoproteins. Self-association of apolipoprotein A-I in aqueous solutions. *J Biol Chem*, 251:1131-6
- Wahl MF, An GH e Lee JM, 1995.** Effects of dimethylsulfoxide on heavy-chain monoclonal antibody production from plant cell culture. *Biotechnol Lett*, 17: 463–8
- Walsh MT, 1999.** A Novel Amyloidogenic Variant of Apolipoprotein AI: Implications for a Conformational Change Leading to Cardiomyopathy. *Am J Pathology*, 154 (1): 11-4
- Westermarck P, 1999.** Nomenclature of amyloid fibril proteins. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest*, 6: 63-6
- Whitelam GC, 1995.** The production of recombinant proteins in plants. *J Sci Food Agric*, 68: 1-9

- Wilson P, 1990.** High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 66: 7A-10
- Wongsamuth R e Doran PM, 1997.** Production of monoclonal antibodies from tobacco hairy roots. *Biotechnol Bioeng*, 54: 401–15
- Woo YM, Hu DWN, Larkins BA e Jung R, 2001.** Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *Plant Cell*, 13: 2297-317
- Yang CY, D Manoogian, Q Pao, FS Lee, RD Knapp, AM Gotto e HJ Pownall, 1987.** Lecithin:cholesterol acyltransferase: functional regions and a structural model of the enzyme. *J Biol Chem*, 262: 3086-91
- Yang Yinong, L Rugang, Qi Min, 2000.** In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal*, 22 (6): 543-551(9)
- Yin Z, Plader W e Malepszy S, 2004.** Transgene inheritance in plants. *J Appl Genet*, 45(2): 127-44
- Yu H e Kumar PP, 2003.** Post transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports* 22: 167–74
- Zannis VI, Karathanasis SK, Keutmann HT, Goldberger G, Breslow JL, 1983.** Intracellular and extracellular processing of human apolipoprotein A-I: secreted apolipoprotein A-I isoprotein 2 is a propeptide. *Proc Natl Acad Sci*, 80: 2574-8
- Zhang F e Boston RS, 1992.** Increases in binding protein (BiP) accompany changes in protein body morphology in three high-lysine mutants of maize. *Protoplasma*, 171: 142-52
- Zhang S, Holmes T, DiPersio M, Hynes RO, Su X e Rich A, 1995.** Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials*, 16:1385–93
- Zhong GY, Peterson D, Delaney DE, Bailey M, Witcher DR, Register JC III, Bond D, Li CP, Marshall L, Kulisek E, Ritland D, Meyer T, Hood EE e Howard JA, 1999.** Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol Breed*, 5: 345–56

### **Laboratori esteri frequentati:**

- Dipartimento di Biotecnologie Molecolari, Università di Aachen (Germania), dal 18 Luglio 2006 al 31 Luglio 2007.

### **Elenco delle pubblicazioni:**

- Poster: "Expression of ApoA-I human apolipoprotein mutants in tobacco plants" presentato al XLIX convegno della Società Italiana di Genetica Agraria, settembre 2005.
- Poster: "Expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) gene into tobacco plants" presentato al L convegno della Società Italiana di Genetica Agraria, settembre 2006.
- Presentazione e Poster : "Espressione in tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) dei geni umani *apo A-I* e *lcat* coinvolti nel catabolismo del colesterolo", presentato alle Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita. 20-21 settembre 2007
- "Propagazione e differenziamento di *Aspidistra elatior*". Articolo pubblicato nel volume "Centri Florivivaistici di Formazione e Orientamento alle Imprese in Campania, attività del triennio 2003-2005"
- "Propagazione e differenziamento di *Strelitzia reginae*". Articolo pubblicato nel volume "Centri Florivivaistici di Formazione e Orientamento alle Imprese in Campania, attività del triennio 2003-2005"

## EXPRESSION OF APOA-I HUMAN APOLIPOPROTEIN MUTANTS IN TOBACCO PLANTS

M. MINUTOLO\*, M.T. VALENTE\*, P. CHIAIESE\*, A. ARCIELLO\*\*, R. PICCOLI\*\*, L. MONTI\*, E. FILIPPONE\*

\*) Department of Soil, Plant and Environmental Sciences, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici (Italy) - filippone@unina.it

\*\*) Department of Structural and Functional Biology, University of Naples "Federico II"

*apolipoprotein, mutants, Nicotiana tabacum, amyloidosis, pharmaceuticals*

Apolipoprotein A-I (apoA-I) is the predominant apolipoprotein of HDL particles. This is a 243-amino acid protein that binds and transports plasma lipid and increases cholesterol efflux from peripheral tissues in a process called "reverse cholesterol transport".

Variant forms of *apoA-I* are the precursor proteins in some forms of systemic disease known as amyloidosis. In all cases, a N-terminal fragment of *apoA-I*, ranging in length from 70 to 100 residues, is incorporated into amyloid deposits. To date, nine different mutations in the *apoA-I* gene have been linked to various forms of hereditary amyloidosis. One of these (named ApoA-I(L174S)) is a missense mutation that occurs in position 174. It has been shown that the presence of the mutation causes the formation of amyloid fibrils composed primarily of a N-terminal-derived polypeptide of 93 amino acids (Apo-93).

So far, ApoA-I(L174S) and Apo-93 proteins are not expressed in any biological system. Biochemical and physiological studies are carried out only on fibrils extracted from the heart of a single dead patient. To facilitate the investigations, we have started a research project to express a suitable amount of these mutant proteins into tobacco cells. We cloned two DNA sequences (one coding for ApoA-I(L174S) obtained by site-specific mutagenesis from ApoA-I wild-type, and the other coding for the N-terminal 93-amino acid fragment of ApoA-I) into two plant binary expression vectors. Each gene was put under the CaMV 35S promoter.

After co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, some transgenic tobacco shoots were obtained from both constructs. Molecular analysis on putative transgenic shoots showed the stable integration of the transgenes. Moreover, transcripts were detected by RT-PCR analyses. Recombinant Apo-93 polypeptide fragment wasn't revealed by western blotting. Instead, recombinant ApoA-I(L174S) protein was detected.

Morphological analyses of ApoA-I(L174S) and Apo-93 transgenic plants did not show any phenotypic variation in comparison with control plants. Further experiments are under way to determine the yield of human recombinant ApoA-I(L174S) protein in transgenic tobacco plants and to develop new strategies to obtain recombinant Apo-93 in plant.

## EXPRESSION OF HUMAN LECITHIN-CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE (LCAT) GENE INTO TOBACCO PLANTS

M. MINUTOLO\*, A. MASSA\*, P. CHIAIESE\*, L. CALABRESI\*\*, G. FRANCESCHINI\*\*, E. FILIPPONE\*

\*) Department of Soil, Plant and Environmental Sciences, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici, Italy - filippone@unina.it

\*\*) Department of Pharmacological Sciences, University of Milano, Via Balzaretti 9, 20133 Milano - laura.calabresi@unimi.it, guido.franceschini@unimi.it

*lcat*, *lecithin:cholesterol acyl transferase*, *Nicotiana tabacum*, HDL, molecular farming

Lecithin: cholesterol acyl transferase (LCAT; EC 2.3.1.43) is a glycoprotein synthesised by liver and secreted into the plasma, where it circulates bound to HDL and LDL complexes. LCAT is responsible for the esterification of free cholesterol and allows formation of mature HDL complex. So, LCAT plays an essential role in reverse cholesterol transport. However, mutations in *lcat* gene cause two human rare forms of dyslipoproteinemia known as familial LCAT deficiency (FLD) and fish eye disease (FED).

In a frame of a Telethon project, in order to study *in vitro* wild and mutated LCAT enzymes to ascertain their physiological activities, it is necessary to have a large amount of those proteins, perhaps expressed in an heterologous system to avoid any interferences with other human or mammals proteins. In this presentation we report the LCAT wild type gene expression into *Nicotiana tabacum* plants. LCAT cDNA was transferred into a pGREEN binary vector, under the control of CAMV 35S promoter, giving rise to the plasmid called pG0029-LCAT. Nuclear genomic DNA amplification by PCR, using specific primer, showed the presence of *lcat* cDNA in 7 of 36 putative transgenic shoots rooted on MS medium added with kanamycin. To confirm the presence of *lcat* transcript, RT-PCR analysis was carried out. This analysis confirmed the presence of *lcat* transcript in 6 of 7 tested plants. Hence, Western analysis was performed to verify the expression of the LCAT enzyme in transformed tobacco plants. Rabbit polyclonal antibody against LCAT protein detected the presence of recombinant LCAT enzyme into transgenic plants. Identification of transgene copy number and quantification of LCAT recombinant enzyme are now in progress.

## **ESPRESSIONE IN TABACCO (*NICOTIANA TABACUM* L.) DEI GENI UMANI APO A-I E LCAT COINVOLTI NEL CATABOLISMO DEL COLESTEROLO**

M. Minutolo<sup>1</sup>, A. Massa<sup>1</sup>, P. Chiaiese<sup>1</sup>, A. Arciello<sup>2</sup>, F. Guglielmi<sup>2</sup>, R. Piccoli<sup>2</sup>, E. Filippone<sup>1</sup>

1) Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Facoltà di Scienze Biotechnologiche

2) Dipartimento di Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Facoltà di Scienze Biotechnologiche

L'uso delle piante come bioreattori oggi rappresenta una realtà concreta ed un nuovo campo d'applicazione per la ricerca. Negli ultimi anni la produzione di biomolecole in piante, prevalentemente di natura proteica, per interesse medico/terapeutico e per uso veterinario o per la salute umana, è cresciuta enormemente con implicazioni di tipo economico e commerciale. Secondo una stima del valore totale dei "Plant made Pharmaceuticals" (PMP) esso si aggirerebbe intorno ai 50 miliardi di dollari nel 2010 (McGrath, 2002). I vantaggi nella scelta di tale piattaforma biotechnologica rispetto agli altri sono dettati da tecniche sempre più efficienti di trasformazione genetica delle specie vegetali, studi sempre più approfonditi di meccanismi di regolazione del metabolismo cellulare che hanno permesso lo sviluppo di diverse strategie mirate all'utilizzo delle piante per la sintesi di prodotti biofarmaceutici (Felsot, 2000; Hood et al., 1999), di enzimi e biopolimeri d'interesse industriale (Guda, 2000). Il nostro gruppo di ricerca propone la pianta di tabacco, poiché specie non alimentare e facilmente coltivabile sia in condizioni in vivo che in vitro, come bioreattore per la produzione di proteine per scopi diagnostici e/o terapeutici.

Il presente lavoro riguarda la produzione di proteine implicate nel catabolismo del colesterolo: l'apolipoproteina (ApoA-I) e la lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT). La lipoproteina ApoA-I costituisce circa il 70% della frazione proteica dell'HDL; studi clinici hanno mostrato che iniezione in vena di ApoA-I riduce la formazione di placche aterosclerotiche. L'azione dell'enzima LCAT è di mantenere un gradiente di colesterolo tra le membrane cellulari e le HDL, facilitandone l'efflusso dai tessuti periferici ed il successivo trasporto al fegato. E' importante, ai fini dello studio dell'attività di questo enzima nel processo di trasporto del colesterolo, produrne grosse quantità in sistemi eterologhi.

I cDNA dei geni *lcat* ed *apoA-I* sono stati clonati in vettori binari d'espressione per pianta. Piante transgeniche di tabacco cv Samsun NN per ciascuno dei due geni sono state ottenute a seguito di co-coltura di espianti fogliari con *Agrobacterium tumefaciens*. Analisi molecolari sui germogli transgenici hanno mostrato la stabile integrazione dei transgeni. Analisi Western hanno rilevato, per ciascun gruppo di piante trattate, la presenza delle due proteine; nel caso del profilo d'espressione delle piante transgeniche per LCAT è stato evidenziato un segnale non corrispondente al peso molecolare della proteina purificata, probabilmente a causa di un diverso grado di glicosilazione rispetto all'enzima wild-type. Successive analisi saranno condotte al fine di verificare il corretto assemblaggio della porzione glicosidica. Infine, è stata riscontrata una più elevata produzione ApoA-I in progenie di piante della generazione T1, forse dovuta ad un effetto di dosaggio genico.



Unione  
Europea



Regione Campania  
Assessorato all'Agricoltura  
e alle Attività Produttive



Ministero delle  
Politiche Agricole  
e Forestali

## *Centri Florovivaistici di Formazione e Orientamento alle Imprese in Campania*



Università  
degli Studi di Napoli  
Federico II

**Attività del triennio  
2003 - 2005**



Consorzio per lo  
Sviluppo della Floricoltura  
nel Meridione

*Coordinamento e elaborazione testo:*

◆ REGIONE CAMPANIA

ASSESSORATO AGRICOLTURA E ALLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

AREA GENERALE DI COORDINAMENTO "SVILUPPO ATTIVITA' SETTORE PRIMARIO"

Settore Sperimentazione, Informazione, Ricerca e Consulenza in Agricoltura.

Dott. Michele Bianco – Dirigente Settore S.I.R.C.A.

Dott. Antonio Di Donna, P.A. Nicola Fontana, Dott. Rosaria Galiano - Settore S.I.R.C.A.

Settore Tecnico Amministrativo Provinciale per l'Agricoltura- Centro Provinciale Informazione e Consulenza in Agricoltura di Napoli

Dirigente Settore T.A.P.A.- Ce-P.I.C.A. di Napoli Dott. Alfonso Tartaglia

Dott. Luciano D'Aponte, P.A. Ferdinando Longo, P.A. Luigi Sicignano, Settore T.A.P.A.- Ce-P.I.C.A. di Napoli

◆ UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Dipartimento di Ingegneria Agraria e Agronomia del Territorio

Prof. Giancarlo Barbieri, Prof.ssa Stefania De Pascale, D.ssa Roberta Paradiso, Dott. Sergio Fiorenza

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente

Prof. Frusciante Luigi, Prof. Edgardo Filippine, Dott. Maria Minutolo, Dott. Pasquale Chiaiese

◆ CONSORZIO PER LO SVILUPPO DELLA FLORICOLTURA MERIDIONALE (CON.FLO.MER)

P.A. Salvatore Colonna, Dott. Vincenzo Picardi

◆ ISTITUTO SPERIMENTALE PER L'AGRUMICOLTURA (ISAGRU) di Acireale

Dott. Caruso Angelo, Dott. Russo Giuseppe, Dott. Recupero Santo

*Si ringraziano:*

- Dott. Italo Santangelo, Dott. Gennaro Casato -Settore S.I.R.C.A

- I tecnici della AGROFLORA C.P.M. ed il personale del Con.Flo.Mer. in servizio presso i Centri Florovivaistici per la fattiva collaborazione in tutte le fasi attuative del progetto.



## ■ 5. PROPAGAZIONE E DIFFERENZIAMENTO DI *ASPIDISTRA ELATIOR* E DI *STRELITZIA REGINAE*

### 5.1 Propagazione e differenziamento di *Aspidistra elatio*

#### 5.1.1 Introduzione

*Aspidistra elatior* è conosciuta ed apprezzata per la longevità delle foglie che sono usate, sia fresche che secche, nelle composizioni floreali (Benz and Johnson, 1986; Hunter, 1994). *A. elatior* è una rizomatosa, perenne, proveniente dall'Asia e dell'Africa. E' caratterizzata da lunghe foglie di colore verde scuro, che si sviluppano direttamente dal rizoma. Alcune varietà presentano foglie variegata o puntinata, di color crema. I fiori dell'*A. elatior* sono molto particolari e spesso sfuggono alla vista, infatti sono a livello del terreno, nascosti tra le foglie, di colore porpora.

L'attività di ricerca è stata focalizzata su applicazioni di miglioramento genetico sulla specie da fronda *A. elatior*, appartenente alla famiglia delle Liliaceae, ed alla messa a punto di un protocollo di massiva propagazione *in vitro* per ridurre i tempi di propagazione.

#### 5.1.2 Materiali e Metodi

##### SCELTA DELLE CULTIVAR DA SAGGIARE

Negli esperimenti sono state utilizzate 2 cultivar di *A. elatior*, appartenenti alla famiglia delle Liliaceae, che differiscono per il colore delle foglie. In particolare, è stata selezionata una cultivar con foglie di colore verde ed una cultivar con foglie variegata (fig. 1; [Http://www.stevensandson.com](http://www.stevensandson.com)). Le cultivar saggiate in questi esperimenti sono state fornite da imprenditori ed esperti del mercato (CONFLOMER di Ercolano).

##### TIPO DI ESPIANTE SAGGIATE

Gli espianti sono stati prelevati dalle cultivar di *A. elatior* selezionate, coltivate in serra singolarmente in vaso di plastica.



Fig. 1. - Foglie recise di *A. Elatior Variegata*, coltivata in vaso

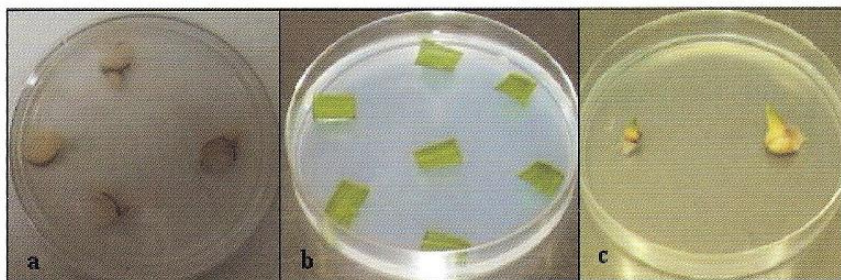
Sono stati saggiati due tipi di espianti:

1. gemme apicali, per la micropropagazione;
2. sezioni da foglie giovani, per il differenziamento.

Per quanto riguarda le gemme, di dimensioni comprese tra 0,5 e 2 cm, mature e ben formate, con e senza nodi, sono state prelevate alla base di foglie già sviluppate o lungo i nodi del rizoma (fig. 2a e 2c).

Per ottenere gli espianti fogliari sono state prelevate foglie giovani con la pagina fogliare non ancora distesa e di colore verde chiaro. Dopo i primi lavaggi in acqua deionizzata, dalle foglie sono state prelevate sezioni di circa 5 x 5 cm. Da tali sezioni, dopo sterilizzazione, sono stati ottenuti espianti di dimensioni pari a 0,5 x 1 cm (fig. 2b).

Fig. 2. - Gemme con nodi (a), espianti fogliari (b) e gemme senza nodo (c) di *A. elatior* incubati, dopo sterilizzazione, su substrato MS.





## STERILIZZAZIONE DEGLI ESPIANTI

Gli espianti sono stati lavati in abbondante acqua corrente; per eliminare polvere, terriccio ed altri contaminanti grossolani è stato fatto uso di una spazzola a setole morbide.

Successivamente, i tessuti sono stati ridotti in porzioni di dimensioni minori e sottoposti ad ulteriori lavaggi. In particolare, per far germinare le spore di microrganismi inquinanti presenti e facilitarne l'eliminazione successiva, i tessuti sono stati incubati in acqua deionizzata (da deionizzatore Millipore ad osmosi inversa, resistenza elettrica di 18,2 Mohm x cm) in agitazione continua, a 24°C per 24h; alla fine del trattamento, gli espianti sono stati nuovamente sciacquati in acqua deionizzata e sottoposti all'azione degli agenti sterilizzanti secondo la formulazione riportata in tabella 1 e seguendo alcuni protocolli selezionati e riportati in tabella 2.

TABELLA 1 – Soluzioni sterilizzanti utilizzate nei protocolli saggiati

Soluzione	Concentrazione	Tempo (minuti)
Etanolo	70%	2-5
*Previcur®	3%	15-20-30
**Barrycidal <sup>“30”</sup>	1-2%	20-30
Ipoclorito di sodio	3-4,9%	15-20-30-40-60
HgCl <sub>2</sub>	0,1-0,5%	15

\* fungicida sistemico il cui principio attivo è il Propamocarb cloridrato al 66,5%;

\*\* antibatterico ad ampio spettro

Tutti i protocolli hanno previsto, alla fine della fase di azione delle sostanze sterilizzanti, almeno 4 risciacqui in acqua deionizzata sterile.

Al termine delle fasi di sterilizzazione, tutti i passaggi in sterilità sono stati effettuati sotto cappa a flusso laminare orizzontale il cui interno è stato reso sterile prima dell'uso per azione di una lampada germicida a raggi UV tenuta accesa per almeno 20 minuti ed il cui piano di lavoro è stato trattato con una soluzione di alcool etilico denaturato al 70%. Tutti gli strumenti non sterili, sono stati sterilizzati alla fiamma di un becco Bunsen.

Per i primi 20 protocolli saggiati, al termine della sterilizzazione i tessuti superficiali sono stati rimossi ed infine le gemme sono state poste sul sub-

TABELLA 2 – Protocolli di sterilizzazione saggiati sugli espianti di *A. elatior*

Protocollo	EtOH	NaOCl	HgCl <sub>2</sub>	Previcur®	Barrycidal <sup>30</sup>
1	5m	3‰x20m	-	-	-
2**	5m	3‰x20m	-	-	-
3*	5m	3‰x20m	-	-	-
4	5m	3‰x30m	-	-	-
5**	5m	3‰x30m	-	-	-
6*	5m	3‰x30m	-	-	-
7	5m	3‰x20m	-	3‰x15m	-
8	5m	3‰x30m	-	3‰x30m	-
9**	5m	3‰x30m	-	3‰x30m	-
10	5m	4,9‰x20m	-	-	-
11	5m	4,9‰x30m	-	-	-
12*	5m	4,9‰x30m	-	-	-
13	5m	4,9‰x30m	-	3‰x30m	-
14	-	3‰x20m	-	-	1‰x20m
15	-	3‰x20m	-	-	2‰x20m
16	-	-	0,1‰x15m	-	1‰x20m
17	-	-	0,1‰x15m	-	2‰x30m
18	-	-	0,1‰x15m	3‰x20m	-
19	-	-	0,5‰x15m	-	1‰x30m
20	-	-	0,1‰x15m	-	2‰x20m
21	5m	3‰x60m	-	-	-
22	5m	3‰x60m	-	-	1‰x30m

\* Sterilizzazione in due fasi

\*\* Sterilizzazione effettuata sottovuoto (-80 KPa)

strato. Nei protocolli n° 21 e n° 22, le gemme sono state anche divise longitudinalmente e quindi poste con la superficie di taglio a contatto con il substrato.

Nei protocolli n° 3, n° 6 e n° 12 i passaggi di sterilizzazione sono stati ripetuti una seconda volta. La seconda fase di sterilizzazione è stata effettuata con le stesse modalità ma con tempi di incubazione dimezzati rispetto alla prima fase.

Nei protocolli n° 2, n° 5 e n° 9 i passaggi di sterilizzazione sono stati effettuati sottovuoto (-80 KPa) per aumentare la superficie dell'espianto accessibile alla soluzione sterilizzante.



Gli espianti sterilizzati sono stati poi trasferiti in capsule Petri da 10 cm sterili monouso contenenti il mezzo di coltura.

#### SUBSTRATI PER IL DIFFERENZIAMENTO E LA PROPAGAZIONE SAGGIATI

La formulazione del substrato base impiegato è quella di Murashige e Skoog (1962) con l'aggiunta di  $30\text{g l}^{-1}$  di saccarosio. Sono state saggiate tre sostanze di crescita, da sole o in combinazione tra loro, come riportato in tabella 3: una auxina (acido naftalenacetico; NAA), una citochinina (6-benzilamminopurina; BAP) ed una sostanza ad attività sia citochininica che auxinica (N-fenil-N-1,2,3-tidiazolo-5-urea; TDZ). I vari substrati sono stati portati a pH 5,8 con l'aggiunta di HCl 0,1N o KOH 0,1N. Al substrato base è stato aggiunto Microagar  $9\text{g l}^{-1}$  (Duchefa) come gelificante.

La sterilizzazione dei mezzi è stata effettuata in autoclave ad una temperatura di  $120^{\circ}\text{C}$  ed alla pressione di 0,12 MPa per 20 minuti.

L'NAA, il BAP ed il TDZ sono stati aggiunti ai substrati prima della sterilizzazione. I substrati sono poi stati dispensati in capsule Petri (20 ml/capsula) per gli esperimenti di differenziamento degli espianti, oppure in vasi di coltura in vetro Pyrex da 500ml (50ml/vaso) per la micropropagazione delle piantine. Ogni substrato è stato saggiato in tre esperimenti indipendenti. Alcuni espianti sono stati incubati in substrato base; tali espianti sono stati utilizzati come controllo per valutare l'effetto dei diversi substrati saggiati.

TABELLA 3 – Soluzioni saggiati per la propagazione (P) ed il differenziamento (D)

Codice Substrato	BAP ( $\mu\text{M}$ )	NAA ( $\mu\text{M}$ )	TDZ ( $\mu\text{M}$ )
MS (D, P)	0,0	0,0	0,0
A (D, P)	0,0	0,0	1,0
B (D, P)	0,0	0,0	5,0
C (D, P)	0,0	0,0	10,0
D (D)	35,5	0,0	0,0
E (D)	17,7	0,0	0,0
F (D)	8,9	0,5	0,0
G (D)	4,4	1,0	0,0
H (D)	2,2	2,7	0,0
I (D)	0,9	5,4	0,0
L (D)	0,9	10,7	0,0
M (D)	0,4	21,5	0,0

### 5.1.3 Risultati e discussioni

#### MICROPROPAGAZIONE

I primi trattamenti di sterilizzazione saggiati sulle gemme hanno evidenziato la difficoltà di ottenere in tempi brevi materiale sterile. Come riportato nella tabella 4, solo dopo il trentesimo giorno di coltura *in vitro* non è stata osservata formazione di ulteriori inquinamenti ma, data l'aggressività delle sterilizzazioni effettuate, è stata evidenziata una forte riduzione della vitalità degli espianti. Al trentesimo giorno di coltura *in vitro* sono state osservate efficienze di sterilizzazione variabili tra lo 0,5% ed il 29,6%. Un unico protocollo, il n° 22, ha mostrato un'efficacia maggiore. Tale protocollo, caratterizzato da un trattamento con battericida all'1% per 20 minuti ed uno in ipoclorito di sodio al 3% per 60 minuti, ha permesso di ottenere il 41,1% di gemme sterili. Tale protocollo ha però danneggiato parzialmente gli espianti: infatti, il 1,4 % delle gemme sterili ottenute è risultata vitale ed ha proseguito il proprio sviluppo. La difficoltà incontrata nella sterilizzazione delle gemme di *A. elatior* è riferibile al forte inquinamento presente nei tessuti provenienti da piante coltivate in piena terra ed alla presenza di patogeni e/o simbionti endogeni di difficile eliminazione. Le contaminazioni causate da batteri e funghi rappresentano un serio problema nelle colture poichè per competere per i nutrienti, quest'ultimi rilasciano tossine che determinano la morte della pianta. La delicatezza dei tessuti meristematici presenti nelle gemme riduce le possibilità di impiego di agenti sterilizzanti più forti o prolungamento dei tempi di sterilizzazione: ciò è evidenziabile dalla ridotta sopravvivenza a seguito dei trattamenti sterilizzanti rivelatisi più efficaci (tab. 4).

In letteratura non sono stati trovati lavori riguardanti la sterilizzazione delle gemme di *A. elatior* ma in altre specie rizomatose come *Astilbe* (Trader *et al.* 2004, Potential Micropropagation Techniques for *Astilbe*. SNA RESEARCH CONFERENCE - VOL. 49 – 2004) i comuni protocolli di sterilizzazione hanno dato lo 0% di espianti sterili.

Nella tabella 5 sono riportati i risultati degli esperimenti di propagazione delle gemme. Per tali espianti sono stati saggiati i protocolli AP, BP e CP, mentre il substrato MS è stato utilizzato come controllo. Per valutare gli effetti del substrato sullo sviluppo delle gemme ne è stato valutato l'accrescimento longitudinale.

Come evidenziato in tabella, nessuno dei tre substrati saggiati ha mostrato effetti significativi sull'accrescimento delle gemme rispetto al controllo.



TABELLA 4 – Percentuale di gemme di *A. elatior* sterili dopo 15 e 30 giorni di coltura *in vitro* e percentuale di sopravvivenza delle gemme sterili dopo 60 giorni di coltura *in vitro*. Il test del  $\chi^2$  è stato applicato sui risultati della frequenza di sterilità rilevata al 30.mo giorno di coltura ed alla frequenza di sopravvivenza al 60.mo giorno. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,05$ .

Protocollo	Espianti saggiati (n°)	Espianti sterili		Sopravvivenza dopo 60 gg (%)
		dopo 15gg (%)	dopo 30gg (%)	
1	166	10,2	6,5 a	35,3 a
2	159	14,7	7,1 a	43,5 a
3	177	9,3	0,9 b	43,8 a
4	148	4,5	0,5 b	0,0 b
5	155	20,5	2,5 b	34,4 a
6	162	5,8	1,9 b	11,1 c, d
7	181	2,6	1,7 b	0,0 b
8	207	27,6	18,2 c, d, f, g	26,3 a
9	152	23,8	17,4 c, d, f, g	33,3 a
10	157	3,5	0,5 b	0,0 b
11	150	13,4	7,0 a	20,0 c, e
12	145	18,0	16,4 c, f, g	30,8 a
13	161	12,3	5,6 a	25,0 a
14	183	16,7	7,7 a	22,6 e
15	149	29,3	25,2 d, e, f, g	27,3 a
16	149	35,4	9,5 a	24,5 a
17	160	17,6	14,8 c, g	32,1 a
18	182	31,4	29,6 e, f	24,6 a
19	176	28,9	24,0 f, g	15,7 d, e
20	189	30,6	27,6 f, g	8,6 d, f
21	166	26,3	21,9 g	4,5 a, f
22	172	42,3	41,1 h	1,4 a
Totale	3.446			

TABELLA 5 – Media e deviazione standard dell'accrescimento percentuale di gemme di *A. elatior* rilevate dopo 30 e 60 giorni di coltura *in vitro*

Substrato (n°)	Espianti saggiati (n°)	Accrescimento gemme	
		dopo 30gg (% $\pm$ ds)	dopo 60 gg (% $\pm$ ds)
MS	30	15,9 $\pm$ 5,7	40,3 $\pm$ 11,8 a
AP	30	18,5 $\pm$ 8,6	36,9 $\pm$ 11,2 a
BP	30	17,3 $\pm$ 5,2	41,7 $\pm$ 10,6 a
CP	30	16,1 $\pm$ 4,9	38,2 $\pm$ 11,1 a

## DIFFERENZIAMENTO

Prima di procedere con i saggi di differenziamento, è stata verificata l'efficienza del protocollo di sterilizzazione degli espianti raccolti da piante allevate in serra. Come riportato in tabella 6, le foglie sono state sterilizzate in modo efficiente mediante il protocollo n°1, quindi è stata effettuata una prova trattando gli espianti con il medesimo trattamento ma per tempi minori: 15 minuti, 10 minuti e 5 minuti. Cinque minuti di trattamento sono stati sufficienti per ottenere il 75% di espianti fogliari sterili. Nonostante quest'ultimo protocollo abbia permesso di ottenere un numero inferiore di espianti sterili, le sterilizzazioni successive sono state effettuate mediante tale protocollo per ridurre al minimo i danni causati dal contatto con la soluzione sterilizzante.

TABELLA 6 – Percentuali di espianti fogliari sterili rilevate dopo 15 e 30 giorni di coltura *in vitro*. Il test del  $\chi^2$  è stato applicato alle frequenze osservate al 30.mo giorno di coltura *in vitro*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,05$

Protocollo di sterilizzazione	Espianti saggiati (n°)	Espianti sterili dopo 15gg (%)	Espianti sterili dopo 30gg (%)
1	150	100	100,00 a
1a	150	100	100,00 a
1b	150	100	100,00 a
1c	150	80	75,33 b

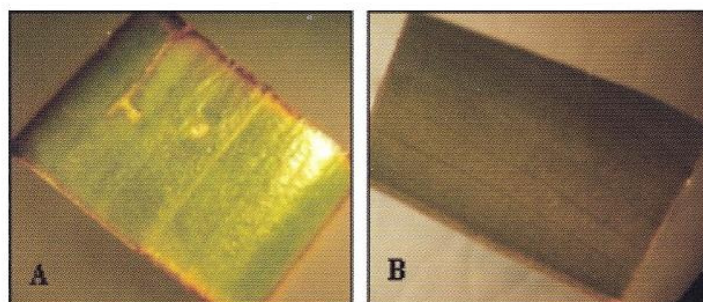
Per gli esperimenti di differenziamento sono stati saggiati 1679 espianti in totale. Nella figura 3 sono riportate le immagini di alcuni espianti fogliari dopo 33 giorni di coltura *in vitro*. Nessuno degli 11 substrati saggiati ha determinato la formazione di callo o di germogli sugli espianti in esame; inoltre, non è stata osservata alcuna differenza rispetto agli espianti posti sul substrato controllo (fig. 3B).

In letteratura è stato trovato un unico lavoro sulla propagazione *in vitro* di *A. elatior*. In tale studio Chen (dati non pubblicati) ha ottenuto formazione di germogli da espianti fogliari utilizzando un substrato MS addizionato con BAP ed NAA. Gli esperimenti non hanno confermato quanto presente in letteratura. Un tale risultato è probabilmente da imputare alla diversa fonte degli espianti, infatti, Chen ha utilizzato espianti prelevati da *vitro*, quindi non danneggiati dal contatto con gli agenti sterilizzanti.



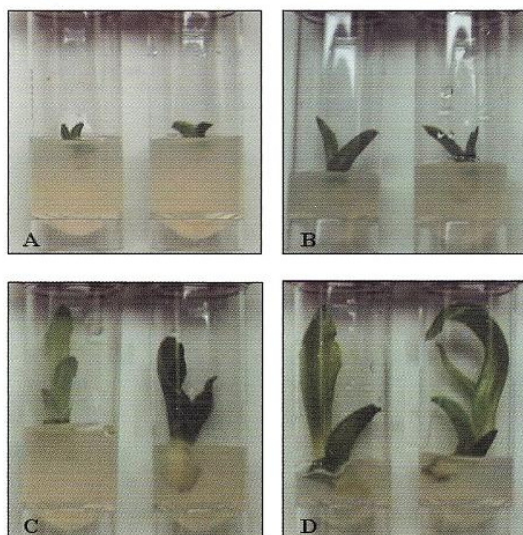
Alla luce di quanto detto sembra evidente ripetere gli esperimenti saggiando nuovamente i protocolli su espianti prelevati da *vitro*.

Fig. 3. - Espianti fogliari di *A. elatior* posti su substrato controllo (B) e su substrato TDZ  $5\mu\text{M}$  dopo 33 giorni di coltura *in vitro*



Non appena le piantine coltivate *in vitro* hanno raggiunto dimensioni sufficienti per il prelievo di un numero congruo di espianti si è proceduto alla ripetizione degli esperimenti con i medesimi substrati, impiegando sezioni di foglie. Questa seconda fase è proseguita molto a rilento a causa del tempo necessario affinché le piante di *A. elatior* coltivate *in vitro* fornissero materiale a sufficienza per saggiare i substrati. Infatti, come mostrato in figura 4, solo dopo 8 mesi di coltura *in vitro* è stato possibile disporre di foglie di dimensioni adeguate per il prelievo degli espianti.

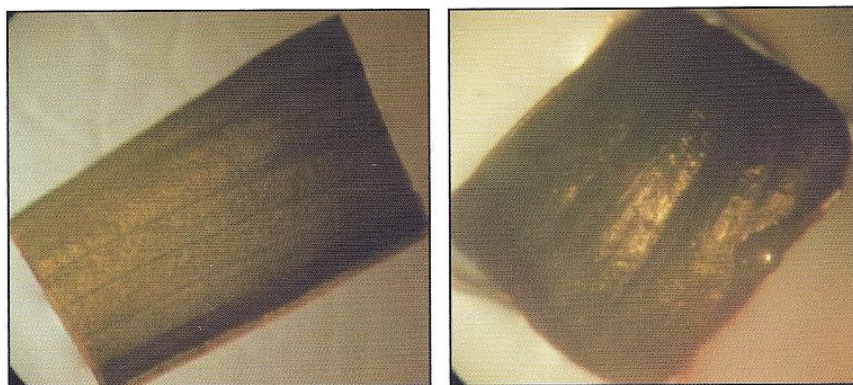
Fig. 4. - Piantine di *A. elatior* dopo due mesi (A), dopo quattro mesi (B), dopo sei mesi (C) e dopo otto mesi (D) dalla messa in coltura delle gemme



Date le ridotte dimensioni delle foglie, è stato possibile prelevare espianti sufficienti per saggiare solo i primi tre substrati, contenenti concentrazioni crescenti di TDZ.

Gli esperimenti hanno evidenziato che anche partendo da *vitro*, quindi annullando l'effetto dannoso della soluzione sterilizzante, al 38° giorno di coltura non è presente formazione di callo o differenziamento su nessuno dei 450 espianti saggiati. Gli espianti posti sul mezzo contenente una concentrazione di TDZ pari a 5mM hanno però mostrato una maggiore turgidità dei tessuti rispetto al controllo (fig. 5). Infatti, su 150 espianti saggiati per tale substrato il 47,8% presentava questa caratteristica di reattività al mezzo di coltura. In futuro sarà quindi opportuno saggiare anche gli altri substrati selezionati su espianti prelevati da coltura *in vitro*.

Fig. 5. - Espianti fogliari di *A. elatior* posti su substrato controllo (A) e su substrato di propagazione con TDZ 5 $\mu$ M (B) dopo 38 giorni di coltura *in vitro*





## 5.2 Propagazione e differenziamento di *Strelitzia reginae*

### 5.2.1 Introduzione

L'uccello del paradiso (*Strelitzia reginae* Aiton) è una pianta nativa dell'Africa del Sud può raggiungere un'altezza pari a 1,2 m ed è caratterizzata da foglie che arrivano fino a 30-40 cm di lunghezza, simili al banano ([Http://www.giardinaggio.it](http://www.giardinaggio.it)). E' conosciuta soprattutto per i fiori molto particolari (fig. 1), l'infiorescenza è, infatti, una brattea a forma di barca che contiene 3 sepal di un color arancio brillante e 3 petali blu/viola. Ogni brattea può dare 4 o 5 fiori, quando un fiore appassisce un altro può fuoriuscire. La specie *Strelitzia* presenta un elevato valore commerciale per la produzione di fiori recisi, in origine è stata considerata come appartenente alla famiglia delle Musaceae, solo successivamente è stata classificata a parte come Strelitziaceae. Tale specie presenta una crescita molto lenta: infatti, partendo da seme, sono necessari dai 5 ai 6 anni prima di ottenere una pianta matura che inizi a produrre dei fiori. Anche con la propagazione per separazione delle piante che si originano dal rizoma sono necessari 1 o 2 anni prima che la pianta ricominci a produrre fiori. Per tale motivo risulta essenziale identificare un protocollo di propagazione che possa ridurre i tempi di entrata in produzione dei fiori. La ricerca è stata quindi finalizzata alla messa a punto di un protocollo di massiva propagazione in vitro per ridurre i tempi di propagazione e successivamente all'ottenimento di varianti per il portamento e la struttura del fiore attraverso mutagenesi sperimentale.

Fig. 1. - Pianta coltivata in vaso, fiore e semi della *cultivar* di *S. reginae* usati negli ultimi esperimenti



## 5.2.2 Materiali e metodi

## TIPO DI ESPIANTI SAGGIATI

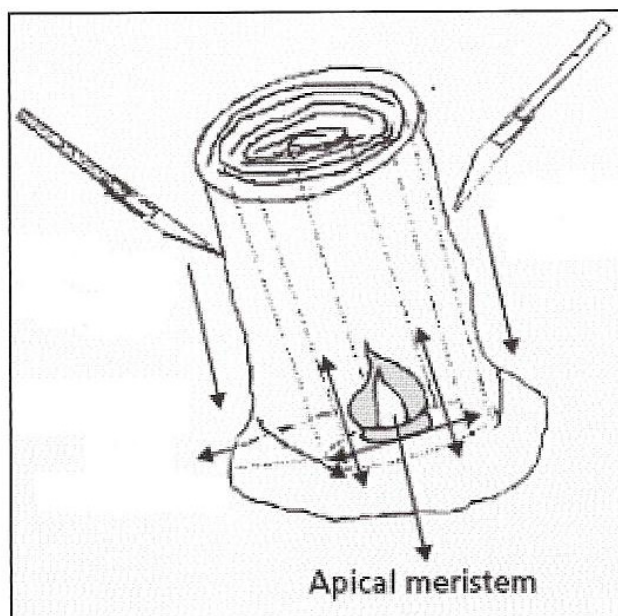
Gli espianti da sterilizzare sono stati prelevati dalla cultivar di *S. reginae* selezionata, coltivata in serra singolarmente in vaso di plastica.

Sono stati saggiati diversi tipi di tessuti:

1. meristema apicale;
2. foglie giovani;
3. radici;
4. semi.

I meristemi apicali sono stati ottenuti dal fusto privato dell'apparato radicale e fogliare. Dopo la sterilizzazione i tessuti esterni sono stati eliminati strato dopo strato fino ad arrivare al meristema apicale (fig. 2). Una volta isolato, il meristema è stato diviso in quattro espianti mediante due tagli perpendicolari.

Fig. 2. - Isolamento del meristema apicale di *Strelitzia reginae* (<http://www.promusa.org>)



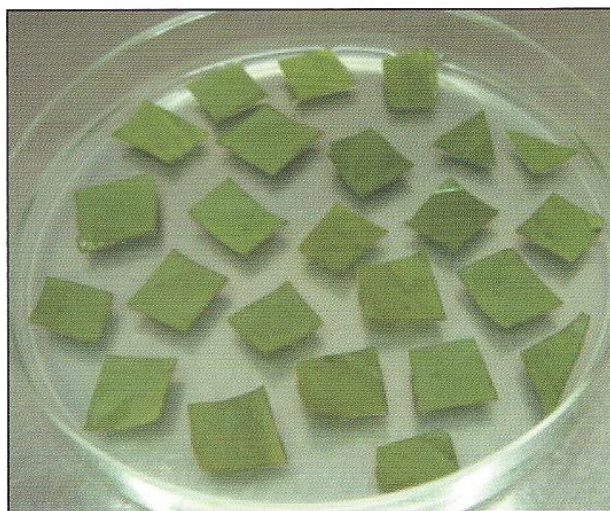
Per ottenere gli espianti fogliari sono state prelevate foglie giovani con la pagina fogliare non ancora distesa e di colore verde chiaro. Dalle foglie sono state prelevate sezioni di circa 5 x 5 cm. Da tali sezioni, dopo sterilizzazione, sono stati ottenuti espianti di dimensioni pari a 0,5 x 1 cm (fig. 3).



Gli espianti radicali sono stati ottenuti da radici con un diametro compreso tra 1 e 1,5 cm. Inizialmente sono stati prelevati porzioni di 5-6 cm di lunghezza, da tali porzioni sono poi state prelevate sezioni di 0,5 cm di spessore.

I semi sono stati sottoposti a sterilizzazione dopo essere stati imbibiti in acqua deionizzata tiepida (27°C) per 72h. Trascorsa la fase di imbibizione si è proceduto con la sterilizzazione. Una parte dei semi è stata incubata sul mezzo di coltura tal quale, mentre l'altra parte è stata incisa con un taglio, e l'embrione, isolato dal tegumento, è stato incubato sul substrato.

Fig. 3. - Espianti fogliari di *S. reginae* incubati, dopo sterilizzazione, su substrato MS



#### STERILIZZAZIONE DEGLI ESPIANTI

Gli espianti sono stati lavati in abbondante acqua corrente; per eliminare polvere, terriccio ed altri contaminanti grossolani è stato fatto uso di una spazzola a setole morbide.

Successivamente i tessuti sono stati ridotti in porzioni di dimensioni minori e sottoposti ad ulteriori lavaggi. In particolare, per far germinare le spore presenti e facilitarne l'eliminazione successiva, i tessuti sono stati incubati in acqua (da deionizzatore Millipore ad osmosi inversa, resistenza elettrica di 18,2 Mohm x cm) in agitazione continua, a 24°C per 24h; alla fine del trattamento, gli espianti sono stati nuovamente sciacquati in acqua deionizzata e sottoposti all'azione delle soluzioni sterilizzanti secondo la formulazione riportata in tabella 1 e seguendo i protocolli riportati in tabella 2.

TABELLA 1 – Soluzioni sterilizzanti utilizzate nei protocolli saggiati

Soluzione	Concentrazione	Tempo (minuti)
Etanolo	70%	2-5
*Previcur®	3%	15-20-30
**Barrycidal <sup>30</sup>	1-2%	20-30
Ipoclorito di sodio	3-4,9%	15-20-30-40-60
HgCl <sub>2</sub>	0,1-0,5%	15

\* fungicida sistemico il cui principio attivo è il Propamocarb cloridrato al 66,5%;

\*\* antibatterico ad ampio spettro

TABELLA 2 – Protocolli di sterilizzazione saggiati

Protocollo	EtOH	NaOCl	HgCl <sub>2</sub>	Previcur®	Barrycidal <sup>30</sup>
1	5m	3% x 20m	-	-	-
1a	5m	3% x 15m	-	-	-
1b	5m	3% x 10m	-	-	-
1c	5m	3% x 5m	-	-	-
2**	5m	3% x 20m	-	-	-
3*	5m	3% x 20m	-	-	-
4	5m	3% x 30m	-	-	-
5**	5m	3% x 30m	-	-	-
6*	5m	3% x 30m	-	-	-
7	5m	3% x 20m	-	3% x 15m	-
8	5m	3% x 30m	-	3% x 30m	-
9**	5m	3% x 30m	-	3% x 30m	-
10	5m	4,9% x 20m	-	-	-
11	5m	4,9% x 30m	-	-	-
12*	5m	4,9% x 30m	-	-	-
13	5m	4,9% x 30m	-	3% x 30m	-
14	-	3% x 20m	-	-	1% x 20m
15	-	3% x 20m	-	-	2% x 20m
16	-	-	0,1% x 15m	-	1% x 20m
17	-	-	0,1% x 15m	-	2% x 30m
18	-	-	0,1% x 15m	3% x 20m	-
19	-	-	0,5% x 15m	-	1% x 30m
20	5m	3% x 60m	-	-	-
21	5m	3% x 90m	-	-	-

\* Sterilizzazione in due fasi

\*\* Sterilizzazione effettuata sottovuoto (-80 KPa)



Tutti i protocolli hanno previsto, alla fine della fase di azione delle sostanze sterilizzanti, almeno 4 risciacqui in acqua deionizzata sterile.

Al termine delle fasi di sterilizzazione, tutti i passaggi in sterilità sono stati effettuati sotto cappa a flusso laminare orizzontale il cui interno è stato reso sterile prima dell'uso per azione di una lampada germicida a raggi UV tenuta accesa per almeno 20 minuti ed il cui piano di lavoro è stato trattato con una soluzione di alcool etilico denaturato al 70%. Tutti gli strumenti non sterili, sono stati sterilizzati alla fiamma di un becco Bunsen.

Nei protocolli n° 3, n° 6 e n° 12 i passaggi di sterilizzazione sono stati ripetuti una seconda volta. La seconda fase di sterilizzazione è stata effettuata con le stesse modalità ma con tempi di incubazione dimezzati rispetto alla prima fase.

Nei protocolli n° 2, n° 5 e n° 9 i passaggi di sterilizzazione sono stati effettuati sottovuoto (-80 KPa) per aumentare la superficie dell'espianto accessibile alla soluzione sterilizzante.

Gli espianti sterilizzati sono stati trasferiti in capsule Petri da 10 cm sterili monouso contenenti il mezzo di coltura.

#### SUBSTRATI PER IL DIFFERENZIAMENTO SAGGIATI

La formulazione del substrato base impiegato è quella di Murashige e Skoog (Plant. Physiol. 1962, 15: 475-479); con l'aggiunta di  $30\text{g l}^{-1}$  di saccarosio. Sono state saggiate diverse sostanze di crescita, da sole o in combinazione tra loro, come riportato in tabella 3: una auxina (acido naftalenacetico; NAA oppure l'acido indolacetico; IAA), una citochinina (6-benzilamminopurina; BAP), sostanze ad attività citochininica come l'acido 2,4-Diclorofenossiacetico (2,4-D), l'adenina, oppure la N6-furfuriladenina (Kinetina), sostanze ad attività sia citochininica che auxinica (N-fenil-N-1,2,3-tidiazolo-5-urea; TDZ), una vitamina (mio-inositolo) ed un amminoacido (l'acido glutammico). I vari substrati sono stati portati a pH 5,8 con l'aggiunta di HCl 0,1N o KOH 0,1N. Al substrato base è stato aggiunto Microagar  $9\text{g l}^{-1}$  (Duchefa) come gelificante. La sterilizzazione dei mezzi è stata effettuata in autoclave ad una temperatura di  $120^{\circ}\text{C}$  ed alla pressione di 0,12 MPa per 20 minuti.

L'NAA, il BAP, il TDZ, il mio-inositolo, l'acido glutammico, l'adenina, l'IAA e la kinetina sono stati aggiunti ai substrati prima della sterilizzazione. Il latte di cocco è stato aggiunto dopo la sterilizzazione, dopo aver fatto raffreddare il substrato. I substrati sono poi stati dispensati in capsule Petri (20 ml/capsula). Ogni substrato è stato saggiato in tre esperimenti indipendenti. Alcuni espianti sono stati incubati in substrato MS; tali espianti sono stati utilizzati come controllo per valutare l'effetto dei diversi substrati saggiati.

TABELLA 3 – Substrati di rigenerazione saggiati. Le quantità dei composti sono espresse in microMoli/litro

SB	MI	Glu	Ade	BAP	IAA	NAA	TDZ	2,4D	Kin
MS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
D	0,1	0,05	0,005	4,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
E	0,1	0,05	0,005	6,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,5
G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	17,6	0,0
I*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
L*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0
M**	0,0	0,0	0,0	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
N***	0,0	0,0	0,0	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

### 5.2.3 Risultati e discussioni

#### STERILIZZAZIONE DEI TESSUTI MERISTEMATICI

I trattamenti di sterilizzazione saggiati, hanno evidenziato la difficoltà di ottenere materiale sterile per le successive sperimentazioni. Come riportato nella tabella 4, solo dopo il trentesimo giorno di coltura *in vitro* non è stata osservata formazione di ulteriori inquinamenti. I protocolli saggiati hanno permesso di ottenere un numero basso di espunti meristematici sterili dai quali si sono sviluppate delle piantine (fig. 4), infatti, al trentesimo giorno di coltura sono state rilevate efficienze di sterilizzazione variabili tra 0 ed il 2,2%.

Nessuno dei 21 protocolli saggiati ha dunque mostrato un'efficacia statisticamente superiore rispetto agli altri. L'insorgenza di inquinamenti anche dopo diversi giorni di coltura *in vitro*, è probabilmente da imputare alla presenza di patogeni endogeni di difficile eliminazione.



Fig. 4. - Piantine di *S. reginae* ottenute da meristema apicale, dopo dieci e trenta giorni dalla messa in coltura su substrato MS



TABELLA 4 – Percentuali di espianti meristemati sterili rilevati dopo quindici e trenta giorni di coltura *in vitro*. Il test del  $\chi^2$  è stato applicato sui risultati della frequenza di sterilità rilevati al 30.mo giorno di coltura. Lettere diverse indicano differenze statistiche significative per  $p \leq 0,05$

Protocollo di sterilizzazione	Espianti saggiati (n°)	Espianti sterili dopo 15gg (%)	Espianti sterili dopo 30gg (%)
1	76	10,12	0,00 a
2	96	1,97	0,00 a
3	96	9,24	0,00 a
4	100	7,75	0,00 a
5	92	25,30	0,00 a
6	96	9,90	0,00 a
7	104	30,31	0,00 a
8	96	16,15	0,00 a
9	98	19,96	2,17 a
10	104	3,75	1,87 a
11	97	22,40	1,23 a
12	108	11,06	0,00 a
13	96	27,68	2,12 a
14	97	3,75	0,00 a
15	100	6,83	1,97 a
16	96	11,29	0,00 a
17	98	1,04	0,00 a
18	95	2,86	0,00 a
19	100	17,46	0,92 a
Totale	1845		

#### STERILIZZAZIONE E DIFFERENZIAMENTO DEGLI ESPIANI RADICALI

In tabella 5 sono riportati i dati relativi alla sterilizzazione degli espianti radicali. Come si nota in tabella la sterilizzazione di tali espianti ha evidenziato le stesse problematiche incontrate durante la sterilizzazione dei tessuti meristemati. I pochi espianti sterili ottenuti sono stati incubati sul substrato controllo (MS) e sui substrati di differenziamento A, B e C.

Gli espianti posti sul substrato A non hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto a quelli posti sul substrato controllo (MS), mentre su alcuni espianti posti sui substrati B e C dopo 15 giorni di coltura *in vitro* si è formato un callo non proliferativo dal quale non si è originato alcun germoglio (fig. 5).

TABELLA 5 – Percentuali di espianti radicali sterili rilevati dopo 15 e 30 giorni di coltura *in vitro*. Il test del  $\chi^2$  è stato applicato sui risultati della frequenza di sterilità rilevata al 30.mo giorno di coltura. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per  $p \leq 0,05$

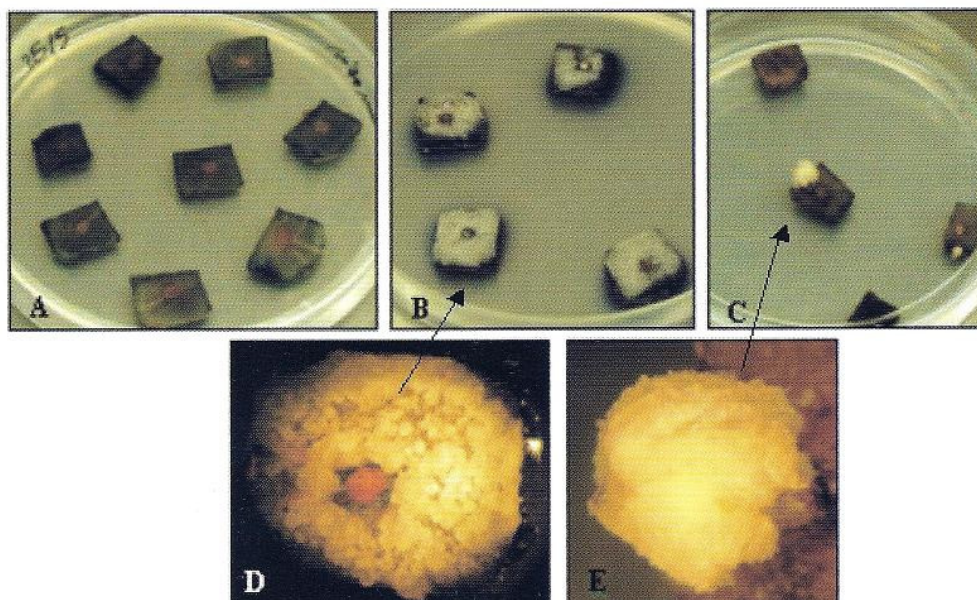
SB	MI	Glu	Ade	BAP	IAA	NAA	TDZ	2,4D	Kin
MS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0
C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
D	0,1	0,05	0,005	4,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
E	0,1	0,05	0,005	6,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,5
G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	17,6	0,0
I*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
L*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0
M**	0,0	0,0	0,0	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
N***	0,0	0,0	0,0	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

TABELLA 6 – Percentuali di espianti radicali mostranti callo dopo 28 giorni di coltura *in vitro*. Il test del  $\chi^2$  è stato applicato sui risultati della frequenza di sterilità rilevata al 30.mo giorno di coltura. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per  $p \leq 0,05$

<b>Substrato</b>	<b>Espianti saggiati (n°)</b>	<b>Espianti formanti callo (%)</b>
MS	45	0,0 a
A	51	0,0 a
B	54	64,3 b
C	56	18,7 c
Totale	206	



Fig. 5. - Espianti di radicali dopo 15 giorni di coltura *in vitro* su substrato controllo (A) e su substrato (B) e C (B)



#### STERILIZZAZIONE E DIFFERENZIAMENTO DEGLI ESPANTI FOGLIARI

Come riportato in tabella 7, le foglie sono state sterilizzate in modo efficiente mediante il protocollo n° 1c. Quest'ultimo ha rappresentato un compromesso tra l'ottenimento di un numero di espianti sufficienti per i saggi successivi e la riduzione al minimo dei possibili danni derivabili dal contatto con la soluzione sterilizzante.

TABELLA 7 – Percentuali di espianti fogliari sterili rilevati dopo 15 e 30 giorni di coltura *in vitro*. Il test del  $\chi^2$  è stato applicato alle frequenze osservate al 30.mo giorno di coltura *in vitro*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per  $p \leq 0,05$

Protocollo di sterilizzazione	Espianti saggiati (n°)	Espianti sterili dopo 15gg (%)	Espianti sterili dopo 30gg (%)
1	150	100	100 a
1a	150	100	100 a
1b	150	100	98 a
1c	150	95	95 b
Totale	600		

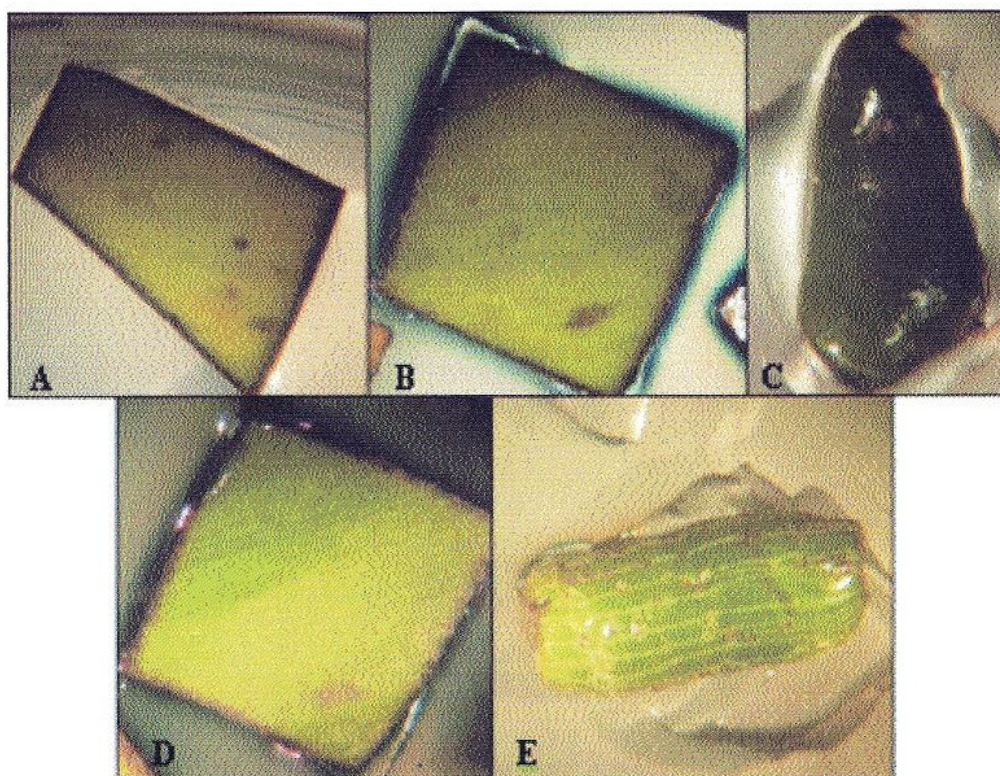
Nessuno dei dodici substrati di differenziamento saggiati ha mostrato effetti



significativi rispetto al controllo: infatti, su nessuno dei 1700 espianti saggiati è stata osservata formazione di callo o di germogli. Gli espianti posti sui substrati E, G e H hanno però mostrato una turgidità del tessuto maggiore rispetto a quelli posti sul substrato controllo (fig. 6). In particolare l'88.6%, il 91.3% e l'85.1%, rispettivamente per i substrati E, G e H, dei circa 150 espianti saggiati ha mostrato tale caratteristica.

I risultati della ricerca non sono confermati da quanto presente in letteratura. Daquinta e colleghi hanno ottenuto una media di 2,5 germogli per espianto, incubando gli espianti fogliari su un mezzo MS contenente BAP ed NAA (concentrazioni non pubblicate). Una tale differenza dai risultati osservati da Daquinta sono probabilmente da imputare all'azione delle soluzioni sterilizzanti, quest'ultime hanno sicuramente ridotto la vitalità e quindi la capacità di differenziare degli espianti fogliari.

Fig. 6. - Espianti fogliari di *S. reginae* dopo 22 giorni di coltura *in vitro* su substrato controllo (A), su substrato di rigenerazione L (b), E (c), N (d) e su substrato H (e)





## STERILIZZAZIONE E GERMINAZIONE DEI SEMI

I semi sono stati sterilizzati mediante il protocollo n° 20, che ha permesso di ottenere un buon numero di semi sterili da saggiare (tab. 8). In letteratura, i tempi rilevati per la germinazione dei semi di *S. reginae* sono assai variabili, compresi tra i 60 ed i 180 giorni di coltura. Per ridurre tali tempi, si è proceduto all'isolamento dell'embrione dal tegumento ed all'incubazione dello stesso direttamente sul substrato.

Come mostrato in tabella 9, in accordo con quanto presente in letteratura, al trentesimo giorno di coltura *in vitro* i semi non sono germinati, gli embrioni, invece, sono germinati rapidamente (fig. 7) dopo appena cinque giorni di coltura. In particolare al settimo giorno è stato rilevato l'83,7% di embrioni germinati. Gli embrioni da semi secchi rappresentano quindi una sorgente di espianti di notevole interesse per il prosieguo degli esperimenti.

TABELLA 8 – Percentuali semi sterili rilevati dopo 15 e 30 giorni di coltura *in vitro*. Il test del  $\chi^2$  è stato applicato alle frequenze osservate al 30.mo giorno di coltura *in vitro*. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per  $p \leq 0,05$

Protocollo di sterilizzazione	Semi saggiati	Semi sterili	
		dopo 15gg (n°)	dopo 30gg (%)
1	40		0,00
20	40		70,00
21	40		71,25
Totale	120		



Fig. 4. - Piantine di *S. reginae* ottenute da meristema apicale, dopo dieci e trenta giorni dalla messa in coltura su substrato MS

TABELLA 4 – Percentuali di espianti meristematici sterili rilevati dopo quindici e trenta giorni di

Tipo d'espianto	Espianti (n°)	Germinati		
		saggiati dopo 30gg (%)	dopo 7gg	dopo 15gg (%)
Semi	157	0,0	0,0	0,0 a
Embrioni	160	83,7	87,5	87,5 b